สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ หอสมุดแห่งชาติ

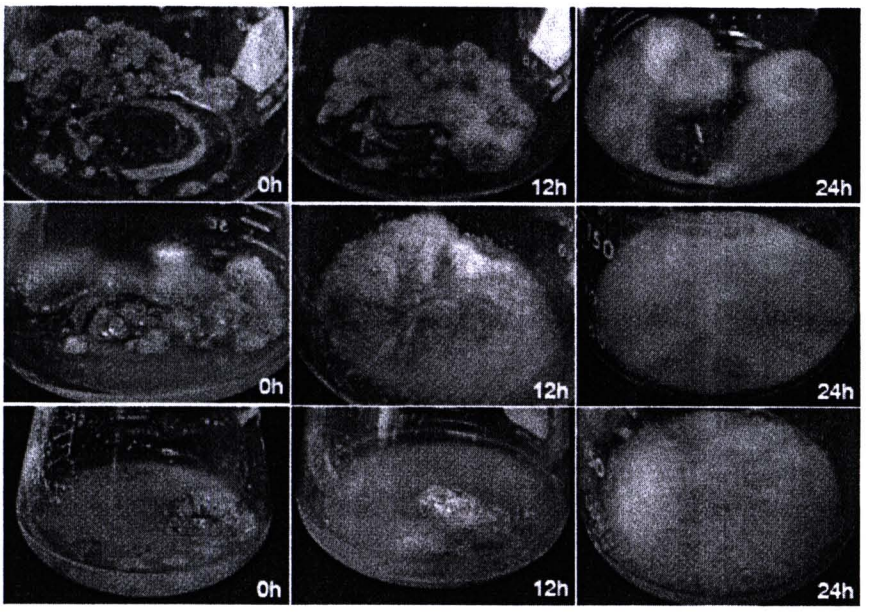
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

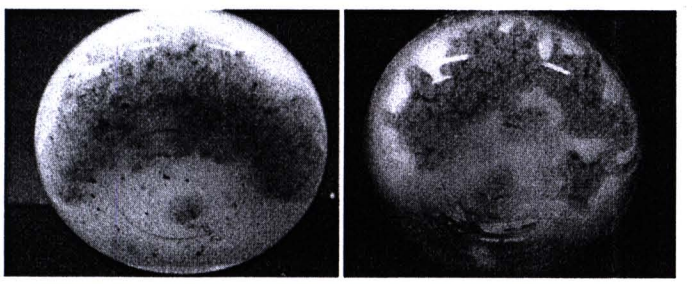
ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งในระดับขวดเขย่าจากกากมันสำปะหลังซึ่งทำหน้าที่เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและวัสดุยึดเกาะสำหรับเส้นใยรา โดยแปรปัจจัยทั้งกายภาพและเคมี ได้แก่ ปริมาณน้ำที่เติมเสริมลงในอาหารแข็งกากมันก่อนเติมหัวเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่าง รอบการเหวี่ยง แหล่งไนโตรเจนเสริมในอาหารแข็งกากมัน การเสริมเอนไซม์ 2 ชนิดก่อนการหมักและระหว่างการหมัก โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิด ได้แก่ เซลลูเลส และกลูโคอะไมเลส

4.1 เปรียบเทียบปริมาณน้ำที่เติมเสริมในอาหารแข็ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และรอบการเหวี่ยง

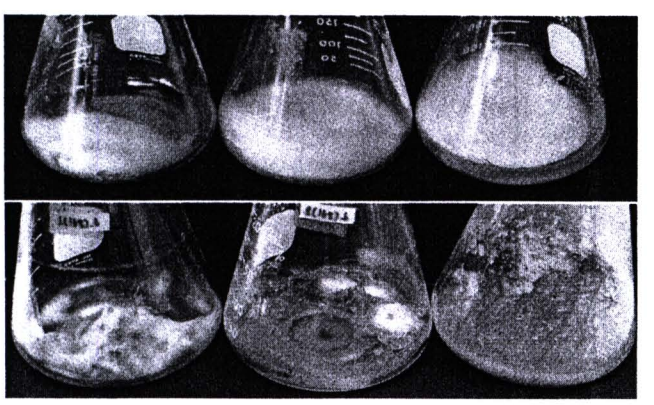
ศึกษาและเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกระดับขวดเขย่าโดยการหมักแบบอาหารแข็งที่ใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ราจะมีการเจริญเติบโตอย่างสังเกตได้ชัดจากชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 ดังแสดงในภาพที่ 4.1 จากนั้นอัตราการเจริญจะลดลงและราจะนำสารอาหารไปใช้ในการดำรงชีวิตและสร้างผลิตภัณฑ์มากกว่าเพื่อการเจริญเติบโต ในการเลี้ยงแบบภาวะที่อยู่นิ่งไม่มีการเขย่านั้น ไมซีเลียของราจะเจริญอยู่บนบริเวณผิวหน้าอย่างเห็นได้ชัด โดยมีลักษณะเป็นเส้นใยฟูอยู่ที่ผิว และมีบางส่วนที่เจริญแทรกซึมเข้าไปในกากมัน ดังแสดงในภาพที่ 4.2 แต่เมื่อนำไปเลี้ยงในภาวะที่รอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที พบว่า ภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริมลงไป 80 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ลักษณะของอาหารเป็นแบบกึ่งของเหลว กล่าวคือ มีน้ำอยู่ในปริมาณมาก ทำให้ไมซีเลียของราเจริญอยู่ในอาหารกึ่งของเหลวผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกับอาหารแทนที่จะปกคลุมอยู่บริเวณผิวหน้า ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ซึ่งต่างจากในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ที่ไมซีเลียของราบางส่วนยังเจริญปกคลุมอยู่บนบริเวณผิวหน้าของกากมัน และเมื่อนำกากมันแห้งหลังการหมักที่ผ่านการระเหิดแห้งโดยใช้ความเย็น(Lyophilize) มาทำการศึกษาหาปริมาณเซลล์ทางอ้อม โดยใช้กลูโคซามีนที่เป็นส่วนย่อยของไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์รา พบว่า ค่าที่ได้ในแต่ละชั่วโมงนั้นไม่ค่อยแตกต่างกันมากนัก แต่มีแนวโน้มในการเจริญในช่วงระยะแรก แล้วจะค่อยๆ คงที่ในชั่วโมงท้ายๆ ดังแสดงในภาพที่ 4.4



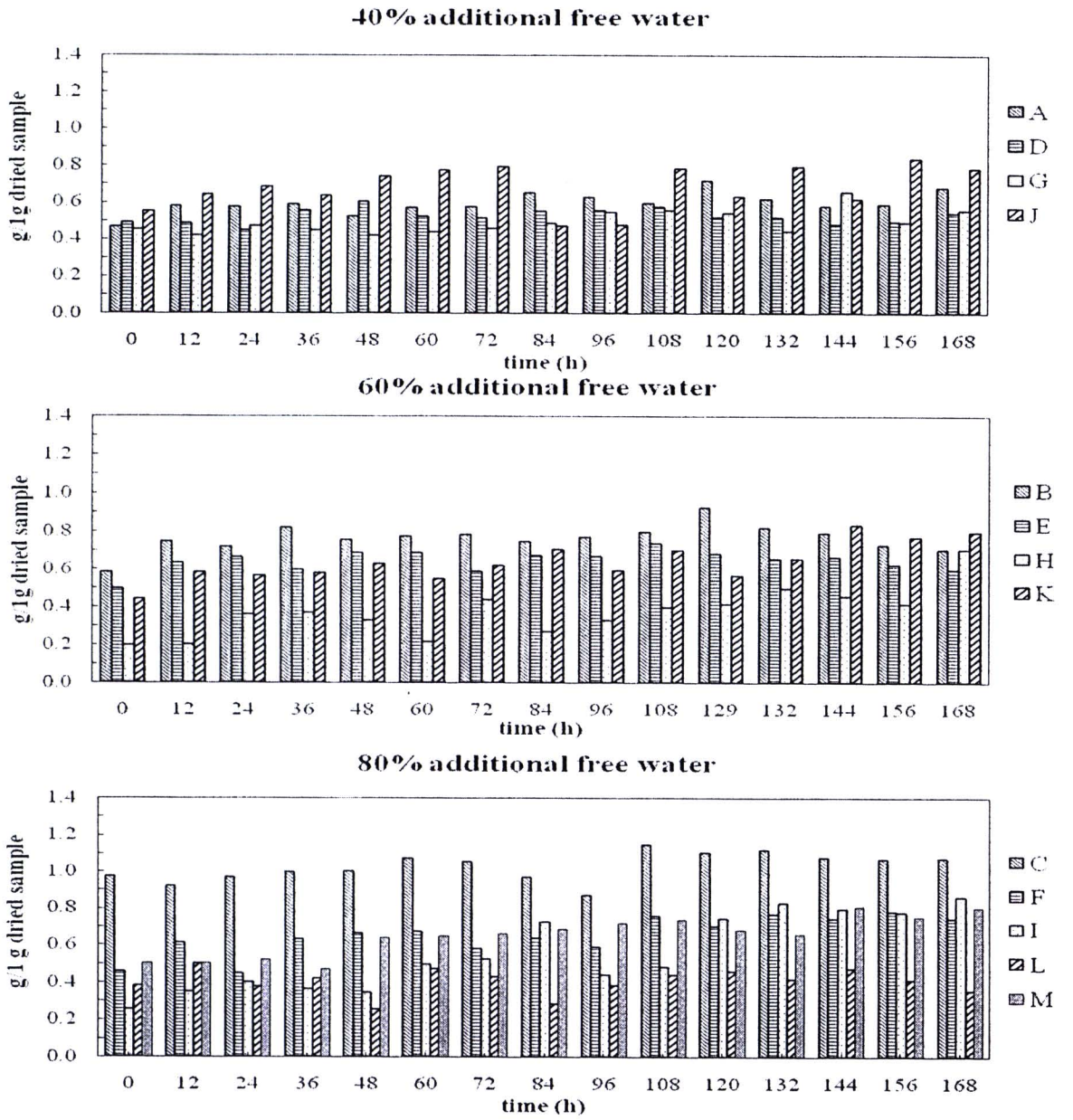
ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเจริญของ *R. oryzae* บนกากมันสำปะหลัง ที่ชั่วโมงที่ 0 12 และ 24 ในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์ (แถวบน) 60 เปอร์เซ็นต์ (แถวกลาง) และ 80 เปอร์เซ็นต์ (แถวล่าง)



ภาพที่ 4.2 ลักษณะการเจริญของ *R. oryzae* ที่ปกคลุมทั่วกากมัน ในภาวะการเลี้ยงแบบไม่มีการเขย่า



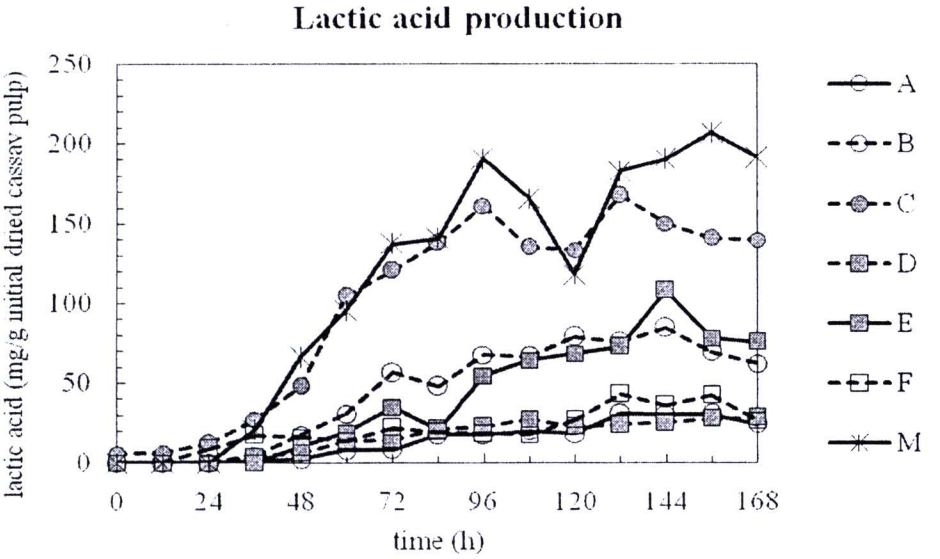
ภาพที่ 4.3 ลักษณะการเจริญของ *R. oryzae* บนกากมันสำปะหลัง ที่ชั่วโมงที่ 168 ในภาวะที่ไม่มีการเขย่า (แถวบน) กับในภาวะที่รอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที (แถวล่าง)



ภาพที่ 4.4 แสดงปริมาณชีวมวล ณ เวลาใดๆ ของ *R. oryzae* ในภาวะการเลี้ยงต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

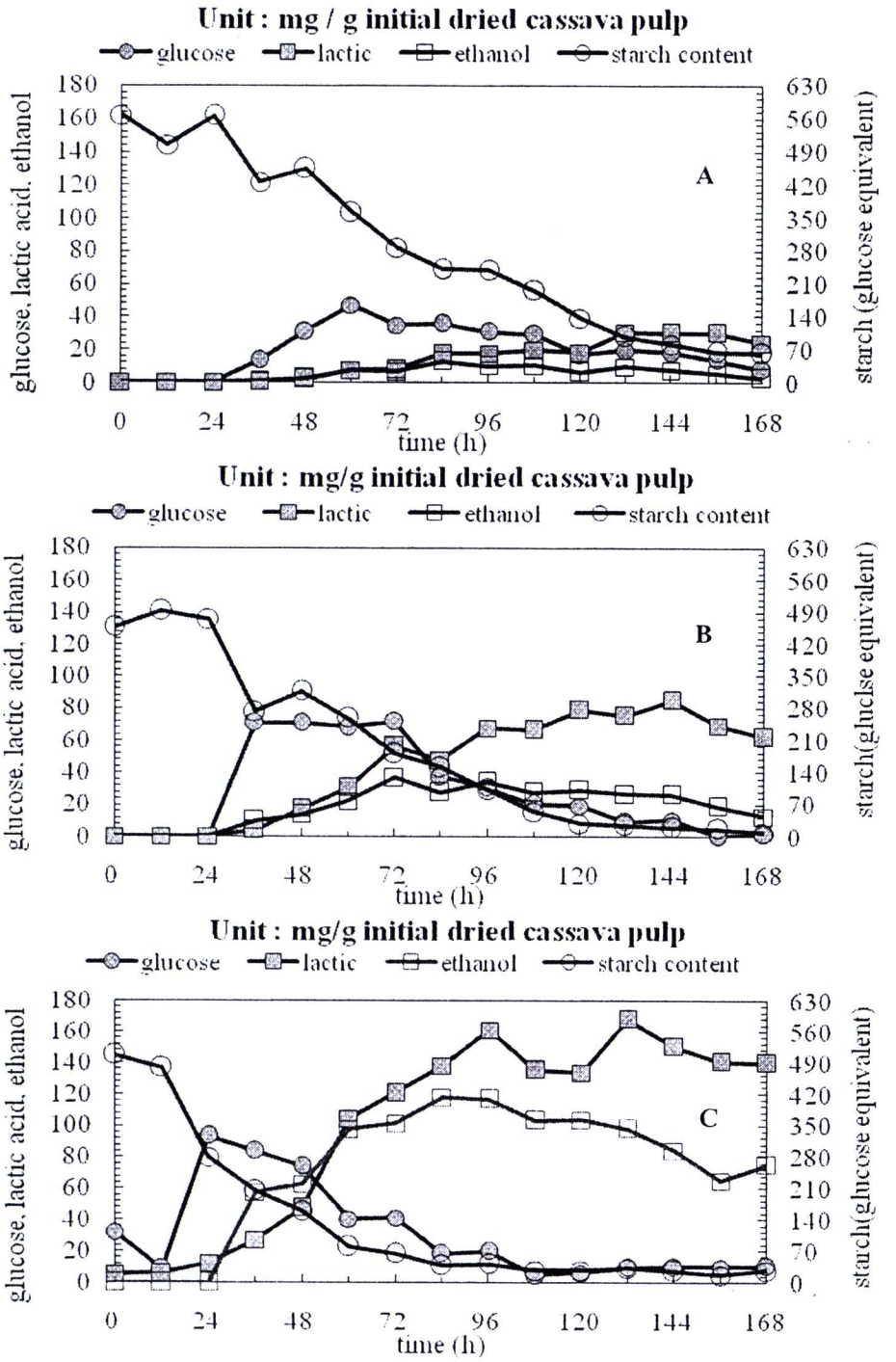
- shaking at 0 rpm, control pH 6.0 (A,B,C)
- shaking at 150 rpm, control pH 6.0 (D,E,F)
- shaking at 0 rpm, no control pH 6.0 (G,H,I)
- shaking at 0 rpm, no control pH 6.0 (J,K,L)
- shaking at 80 rpm, control pH 6.0 (M)

การหมักที่รอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที มีผลต่อผลผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากทั้งส่วนที่เป็นกากมันและราที่เจริญครอบคลุมอยู่มีการเคลื่อนที่เกาะกลุ่มไปพร้อมๆ กัน แต่สำหรับภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ที่มีลักษณะของอาหารแบบกึ่งของเหลว มีน้ำอยู่ในระบบมากทำให้ขณะที่ทำการเขย่าอยู่นั้น อาหารและราบางส่วน จะติดอยู่ข้างๆ ขวด ซึ่งบ่งบอกได้ว่าความเร็วในระดับนี้รุนแรงเกินไปสำหรับการหมักที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแรงที่เกิดขึ้นนี้ อาจทำให้เกิดแรง ที่เรียกว่า "แรงเฉือน"ขึ้น ซึ่งมีผลต่อการเกิดความเสียหายและทำลายเซลล์บางส่วน เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานของราเองที่เป็นแบบเซลล์แขวนลอยเมื่อต้องอยู่ในภาวะที่มีแรงมาปะทะสูงๆ ทำให้เส้นใยราขาด แตกหักเป็นชิ้นๆ (Fragmentation) และเสียหายได้จึงมีแนวโน้มเป็นไปได้ว่าแทนที่เซลล์จะสร้างผลิตภัณฑ์ เซลล์จึงต้องเปลี่ยนวิถีเมแทบอลิซึมเป็นสร้างเซลล์และรักษาสภาพแทน ผลกระทบที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์รากับแรงที่เกิดการจากการกวนผสม (mixing) นั้น เป็นหลักการทางเชิงกลของการแตกหักของไมซีเลีย เนื่องจากแรงเฉือนที่มากเกินไป (Piccoli-Valle, 2003) ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองโดยลดรอบการเหวี่ยงลงเหลือ 80 รอบต่อนาที พบว่า ผลผลิตกรดแลกติกที่ได้มีปริมาณสูงกว่าทุกภาวะที่การหมักทั้งแบบไม่มีการเขย่าและเขย่า โดยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และยังพบว่าการเขย่ายังช่วยลดปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นด้วย ดังแสดงในภาพที่ 4.6 ถึง 4.8 เนื่องจากรา *R. oryzae* เป็นราที่ต้องการอากาศในการเจริญ Tay และ Yang (2002)

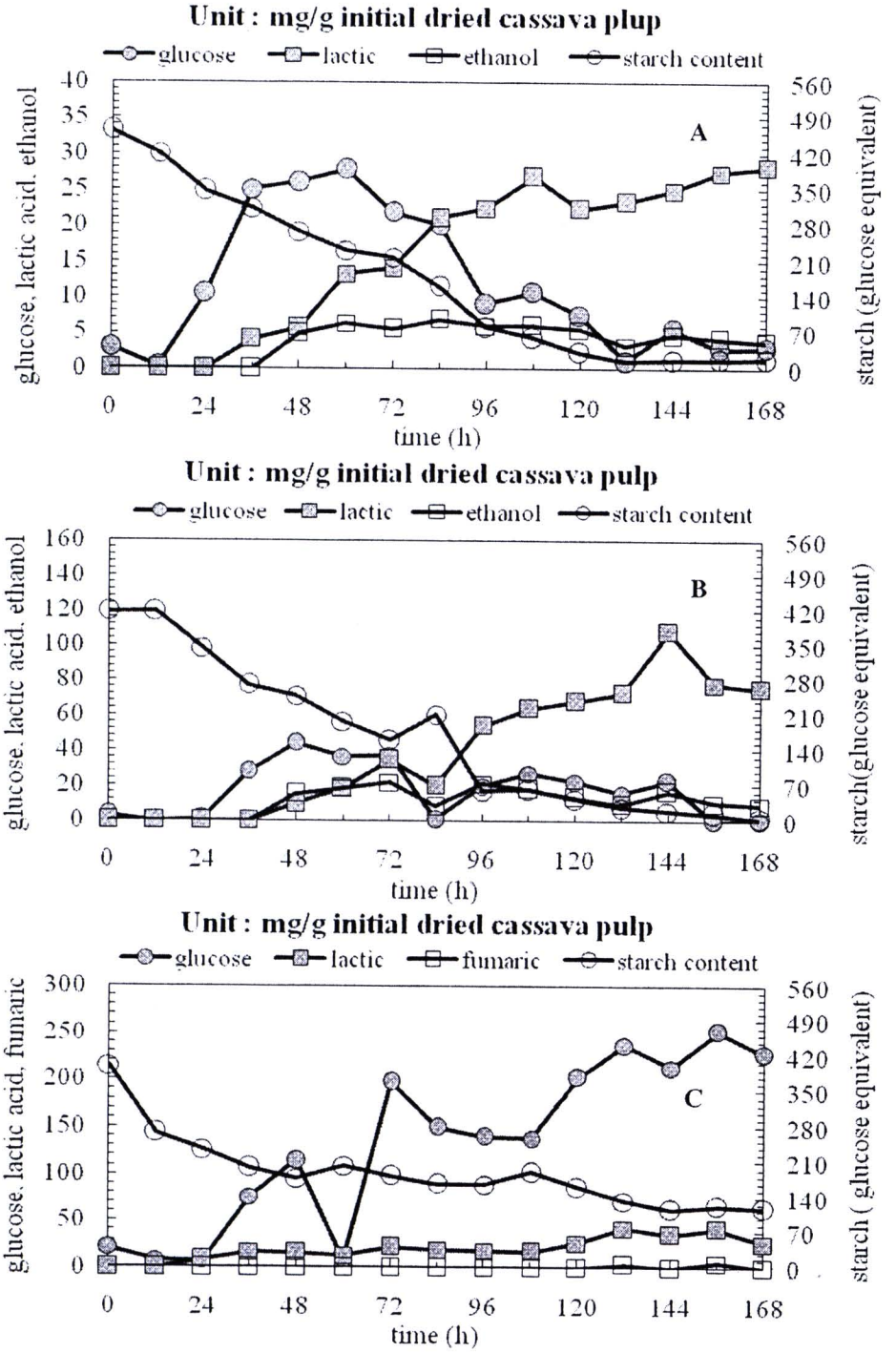


ภาพที่ 4.5 จลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังโดยแปรเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริมและความเร็วรอบการเหวี่ยง มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

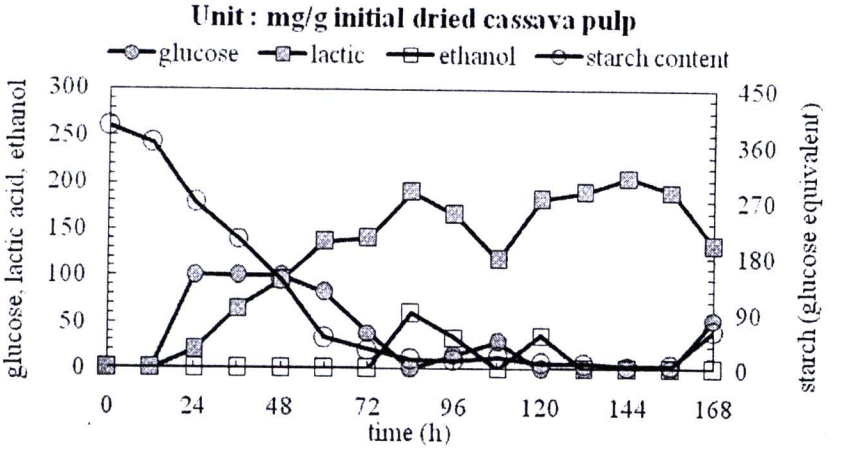
- 40% additional free water, 0rpm, control pH (A)
- 60% additional free water, 0rpm, control pH (B)
- 80% additional free water, 0rpm, control pH (C)
- 40% additional free water, 150rpm, control pH (D)
- 60% additional free water, 150rpm, control pH (E)
- 80% additional free water, 150rpm, control pH (F)
- 80% additional free water, 80rpm, control pH (M)



ภาพที่ 4.6 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์, B คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 เปอร์เซ็นต์, C คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.7 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์, B คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 เปอร์เซ็นต์, C คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์

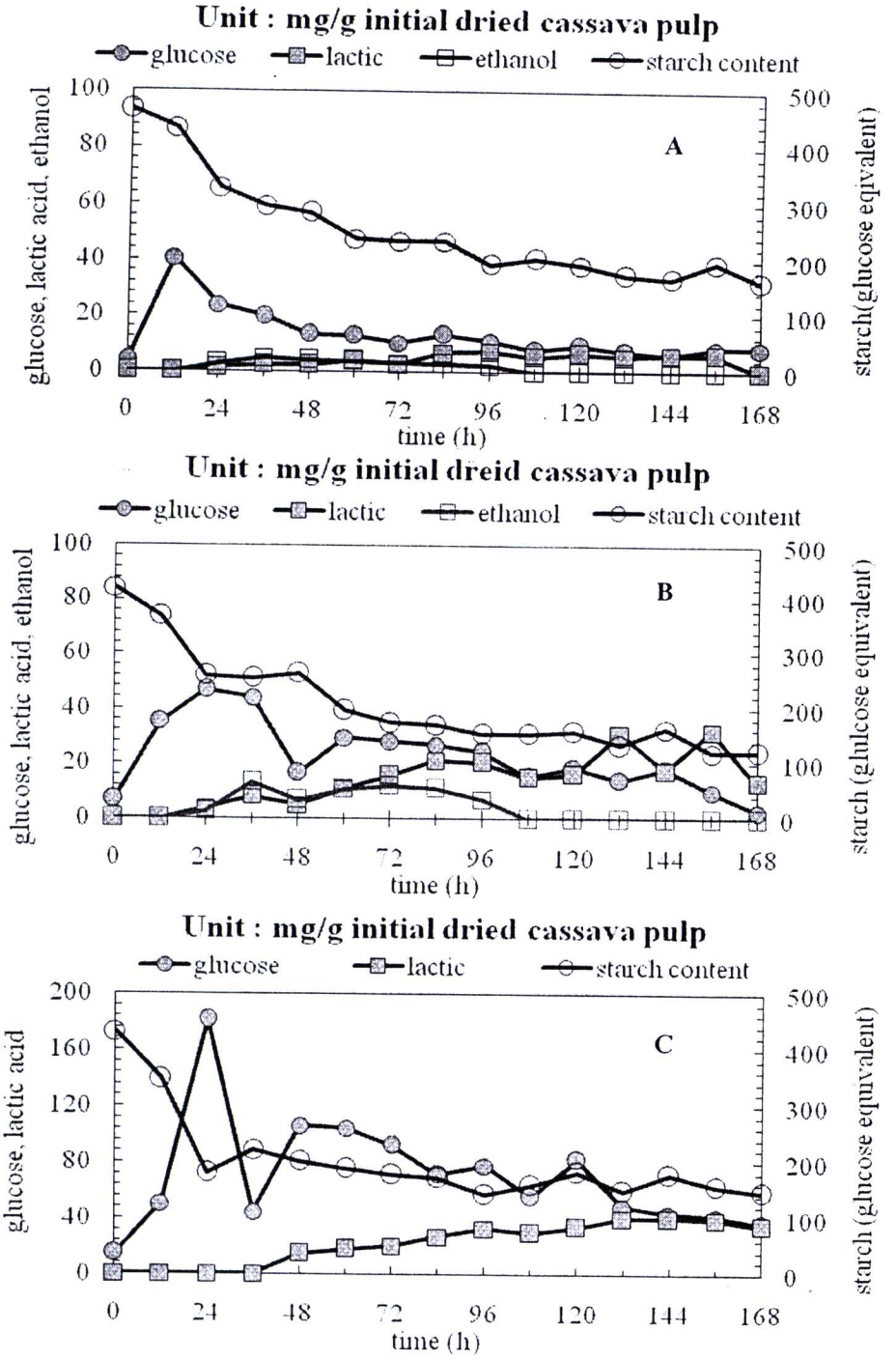


ภาพที่ 4.8 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

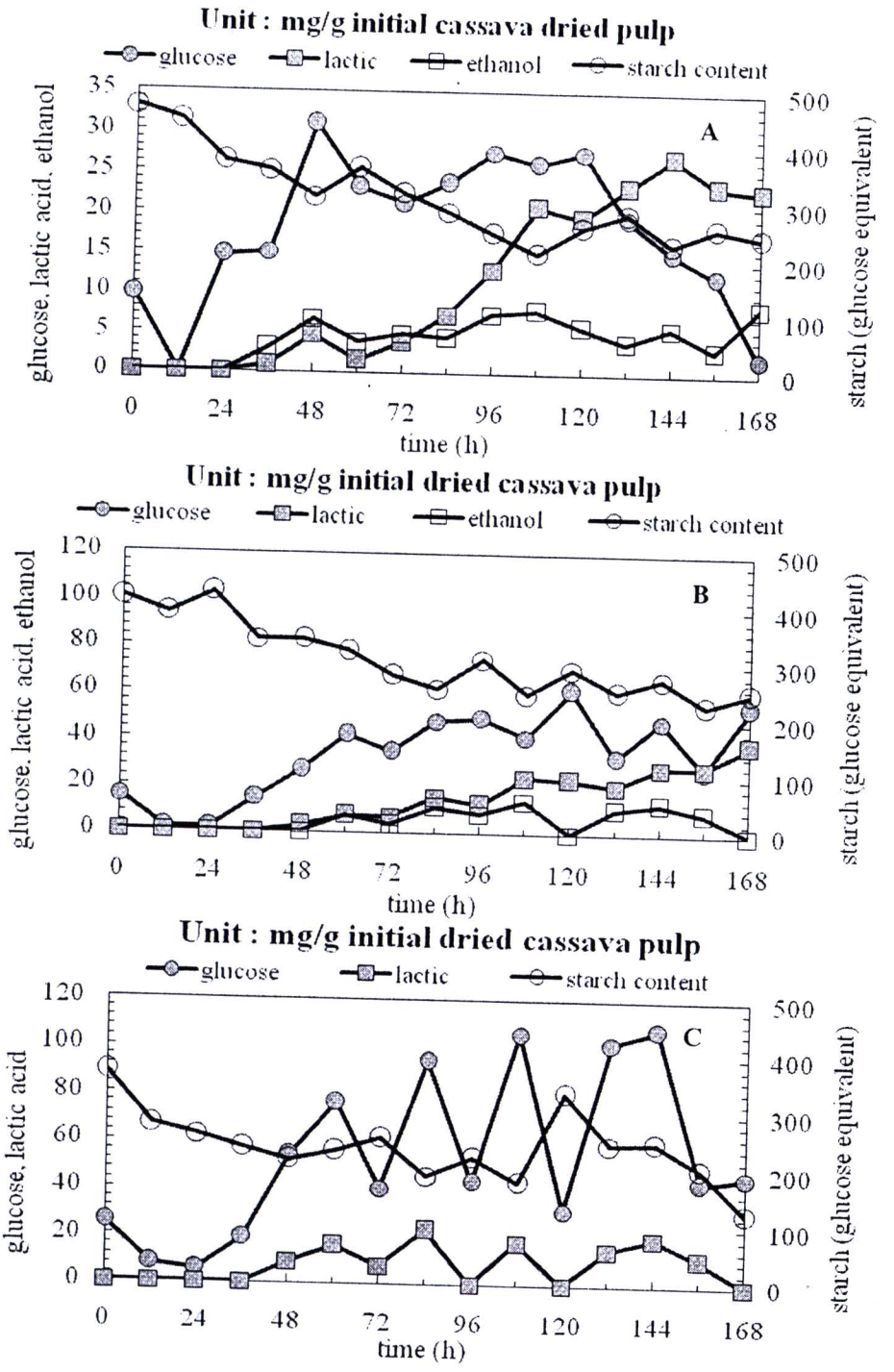
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของราอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับการหมักที่ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างดังแสดงในภาพที่ 4.9 และ 4.10 กับการหมักภาวะที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างอย่างชัดเจน โดยค่าความเป็นกรด-ด่างมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ จากค่าเริ่มต้นประมาณ 4.5 ไปจนถึง 2.0 เนื่องจากรามีการเจริญเติบโตและกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสมดุลของไฮโดรเจนไอออน ที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร (Gulati และคณะ, 1999; Cheilas และคณะ, 2000; Elibol และ Ozer, 2000; Martak และคณะ, 2003) อีกทั้งรามีการผลิตและปลดปล่อยกรดแลกติกออกมา ทำให้เมื่อถึงภาวะที่มีความเป็นกรดด่างไม่เหมาะสมจึงมีอัตราการผลิตลดลง ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกอยู่ที่ 5.0 – 6.0 (Huang และคณะ, 2003) Tay และ Yang (2002) รายงานว่า ปริมาณของกรดแลกติก เอทานอล และกรดฟูมาริกจะลดลงเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจาก 6.0 เป็น 4.0 ซึ่ง Miura และคณะ (2003) สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 93 กรัมต่อลิตรที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 – 6.5 Rosenberg และ Kristofikova (1995) พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4.8 - 6.0 ไม่มีผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์อื่น เช่น กรดมาลิกและกรดฟูมาริก เป็นต้น Miura และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยรากลายพันธุ์ *Rhizopus* sp. MK-96-1196 ในถังหมักแบบ Air-lift โดยใช้แป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยได้เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4.5 - 6.5 พบว่า ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 93 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.60 กรัมต่อลิตรต่อ

ชั่วโมงเทียบกับที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 สามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 78 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 73 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

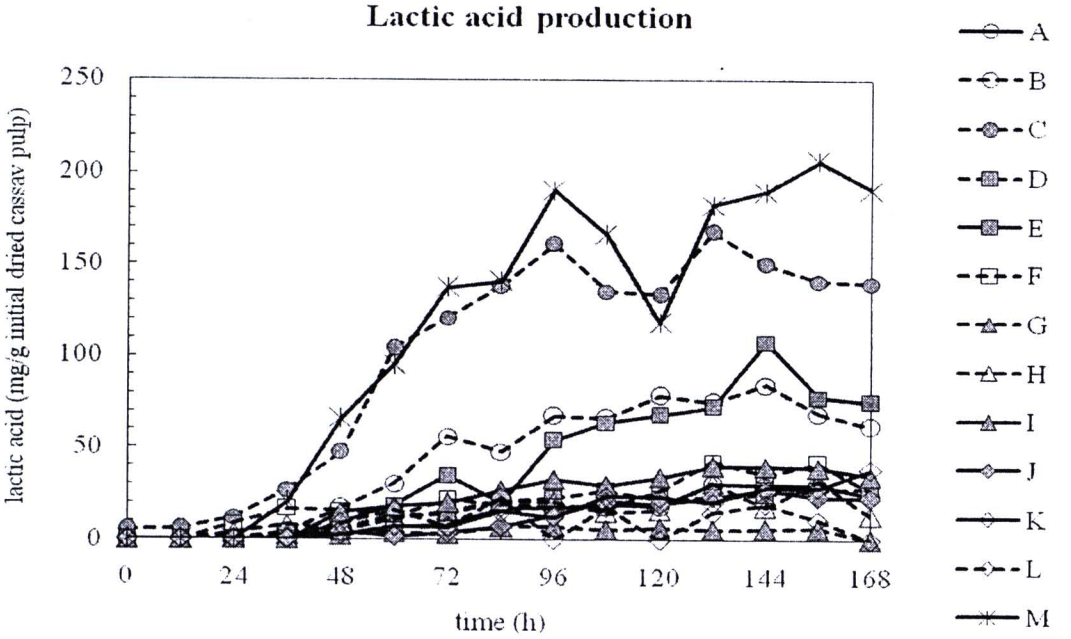
การศึกษาถึงปริมาณน้ำที่เติมเสริมที่แตกต่างกัน โดยการเติมน้ำอิสระเข้าไปในปริมาณที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำที่เติมเสริม เป็น 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับน้ำหนักรวมทั้งหมด พบว่า ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ให้ผลผลิตกรดแลกติกมากกว่าที่ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ในทุกๆ ภาวะ ดังแสดงในภาพที่ 4.11 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำที่เติมเสริม การผลิตกรดแลกติกจะเพิ่มขึ้น หลังจากที่สปอร์เกิดการงอก เส้นใยของราจะยืดขยายสังเกตได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และเห็นได้อย่างชัดเจนที่ชั่วโมงที่ 24 ดังภาพที่ 4.1 เส้นใยที่เจริญนี้จะมาล้อมรอบส่วนที่เป็นของแข็งและเม็ดแป้ง ซึ่งในระหว่างการหมัก แป้งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ที่ราสร้างแล้วหลั่งออกมาและจะถูกแทนที่ด้วยเส้นใยของราทำให้รวมตัวเป็นก้อนเดียวกับกากมัน คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ดีส่วนหนึ่งนั้นหายไปจากอาหารที่ใช้หมักผ่านทางกระบวนการหายใจซึ่งออกไปในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ การละลายน้ำและการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วและเป็นเนื้อเดียวกันของคาร์โบไฮเดรต ทำให้เอนไซม์ที่ราผลิตสามารถเข้าไปย่อยสลายแป้งให้กลายเป็นกลูโคสได้ดี มีแนวโน้มที่น่าเชื่อได้ว่าอาหารหมักที่อยู่ในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริมสูงความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตและเอนไซม์ลดลง และเป็นการทำให้ซับเสตรทเกิดอาการบวมน้ำ ซึ่งเป็นการง่ายต่อการนำซับสเตรทไปใช้ของจุลินทรีย์ (Xavier, 1994) สอดคล้องกับผลการทดลองปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลผลิตกรดแลกติกน้อยลง



ภาพที่ 4.9 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์, B คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 เปอร์เซ็นต์, C คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์



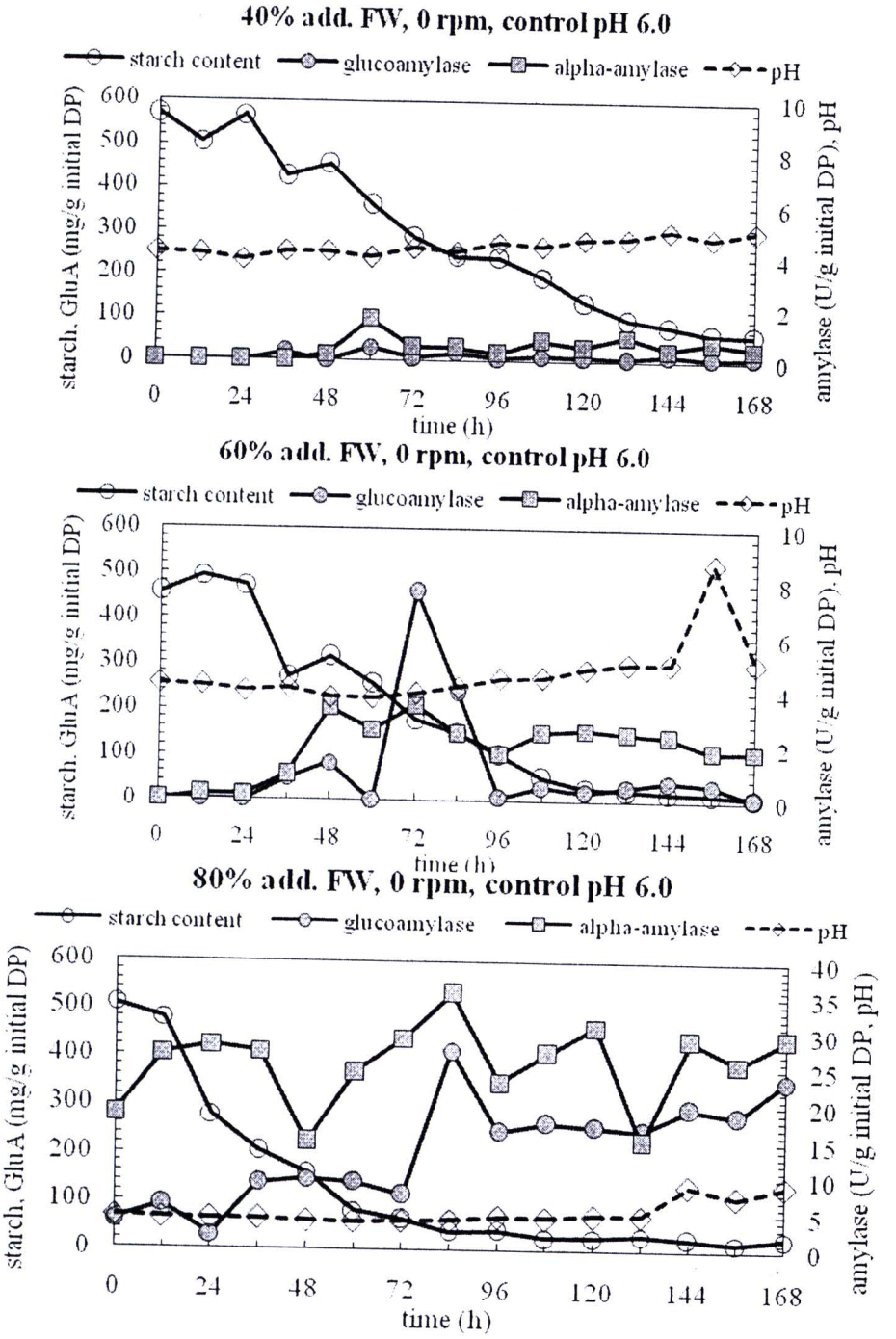
ภาพที่ 4.10 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์, B คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 เปอร์เซ็นต์, C คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์



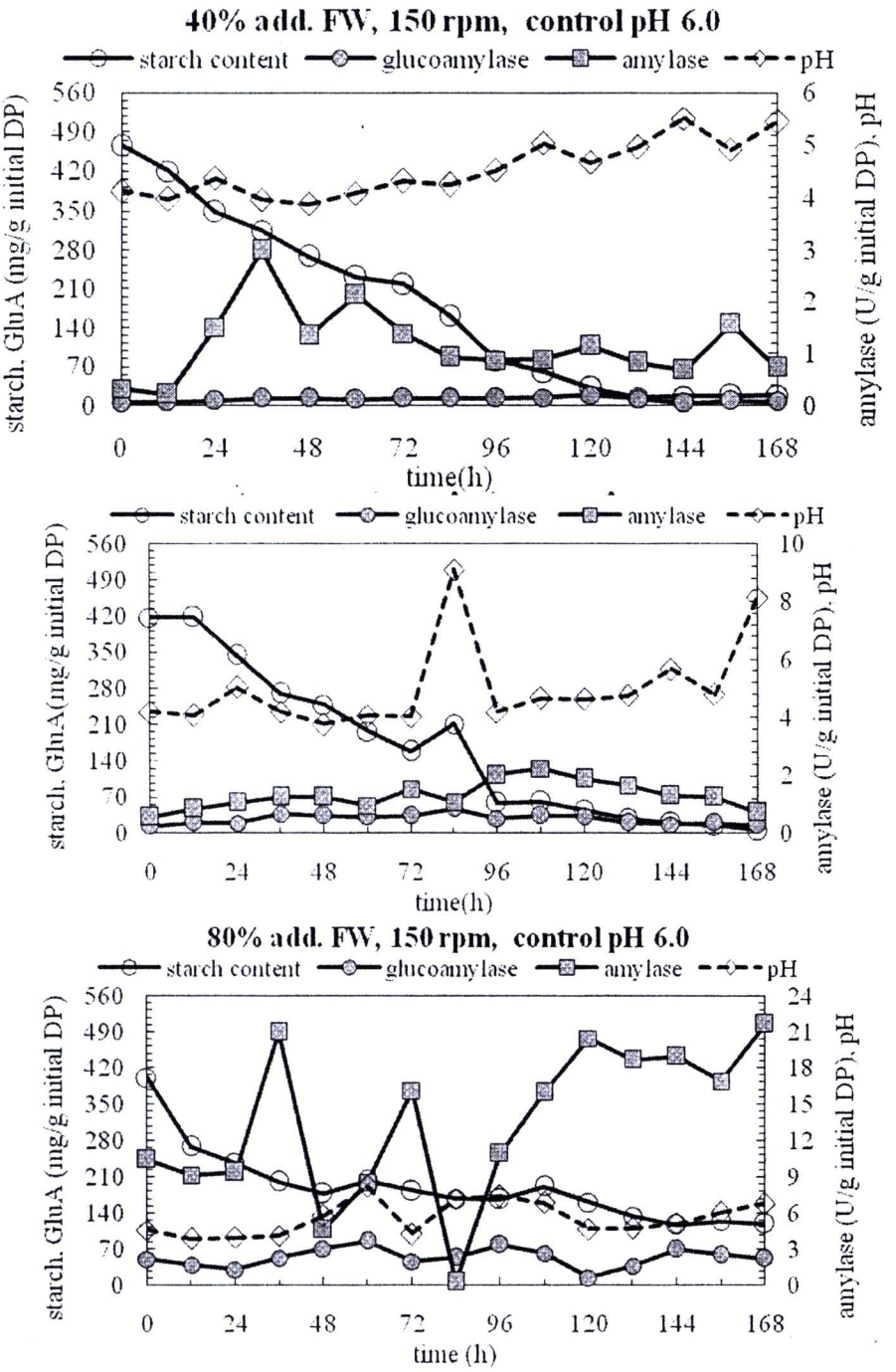
ภาพที่ 4.11 จลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังโดยแปรเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริมและความเร็วรอบการเหวี่ยง มีและไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

—○—	40% additional free water, 0rpm, control pH	(A)
-○-	60% additional free water, 0rpm, control pH	(B)
-◉-	80% additional free water, 0rpm, control pH	(C)
-▣-	40% additional free water, 150rpm, control pH	(D)
—▣—	60% additional free water, 150rpm, control pH	(E)
-▣-	80% additional free water, 150rpm, control pH	(F)
-△-	40% additional free water, 0rpm, No control pH	(G)
-△-	60% additional free water, 0rpm, No control pH	(H)
—△—	80% additional free water, 0rpm, No control pH	(I)
—◇—	40% additional free water, 150rpm, No control pH	(J)
—◇—	60% additional free water, 150rpm, No control pH	(K)
-◇-	80% additional free water, 150rpm, No control pH	(L)
—✳—	80% additional free water, 80rpm, control pH	(M)

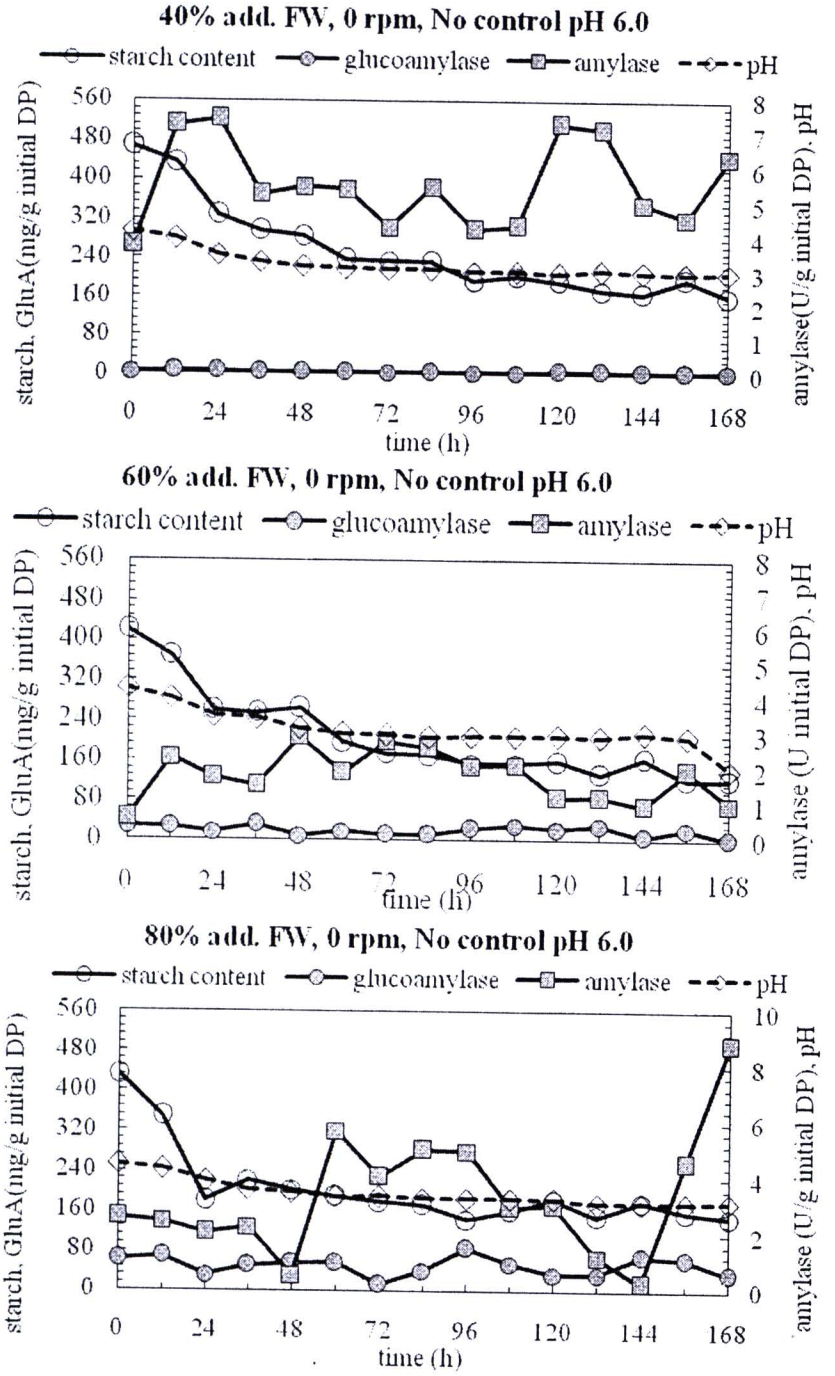
เมื่อทำการศึกษาแอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส พบว่า *R. oryzae* สามารถสร้างและปล่อยอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเพื่อย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังเป็นกลูโคสเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ดังแสดงในภาพที่ 4.12 ถึง 4.15 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง แป้งที่เหลืออยู่ในกากมัน (รายงานโดยใช้ปริมาณกลูโคสเทียบเท่า) ยังคงมีอยู่ในปริมาณมาก บ่งบอกได้ถึงผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเฉพาะอะไมเลส ทำให้ไม่สามารถทำการย่อยแป้งที่มีอยู่ในกากมันออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้มีอาหารที่จะนำไปใช้ในการสร้างกรดแลกติกได้น้อย ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดแลกติกที่สามารถผลิตในภาวะที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้มากกว่าภาวะที่ไม่มีการควบคุม



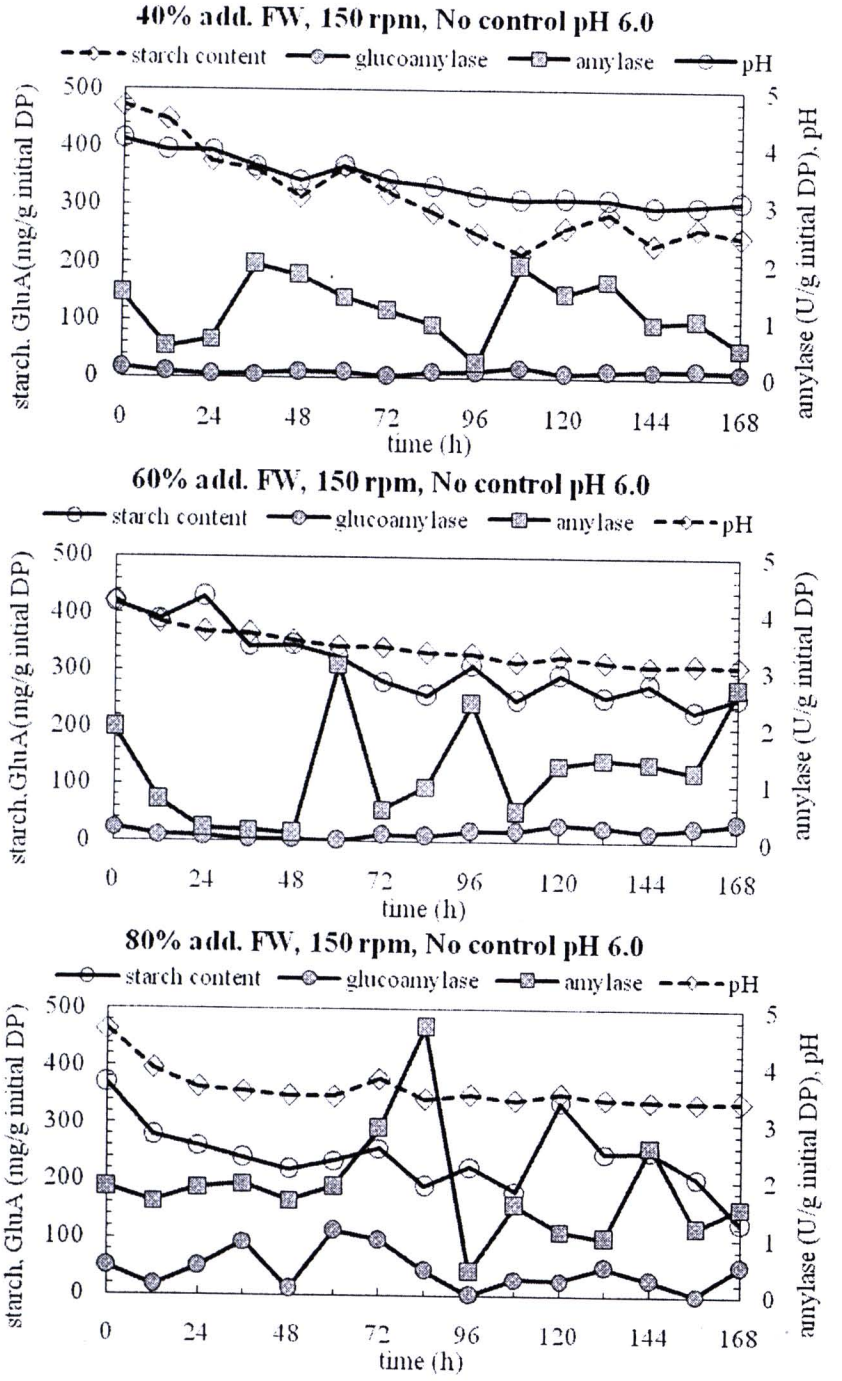
ภาพที่ 4.12 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.13 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.14 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



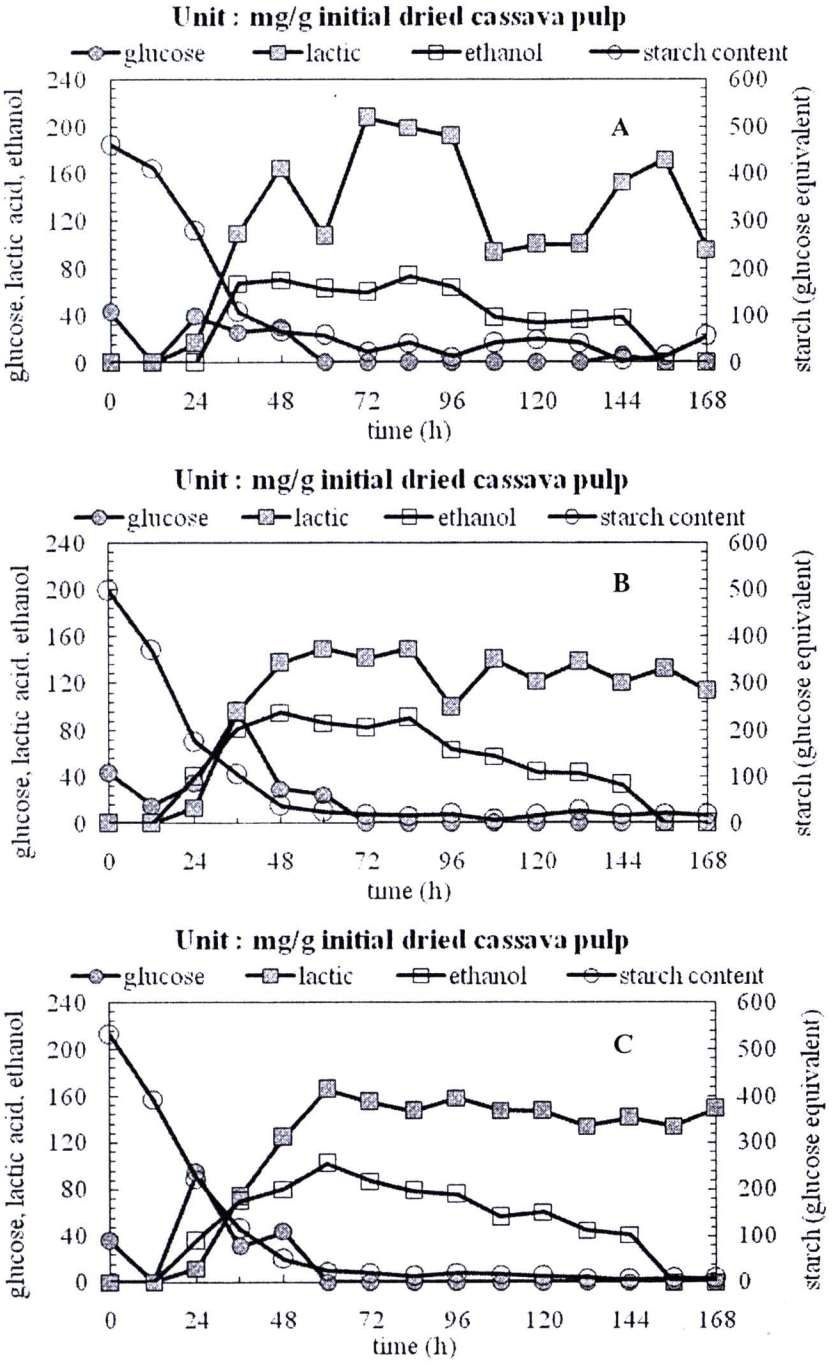
ภาพที่ 4.15 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.2 การหมักโดยเติมแหล่งไนโตรเจน

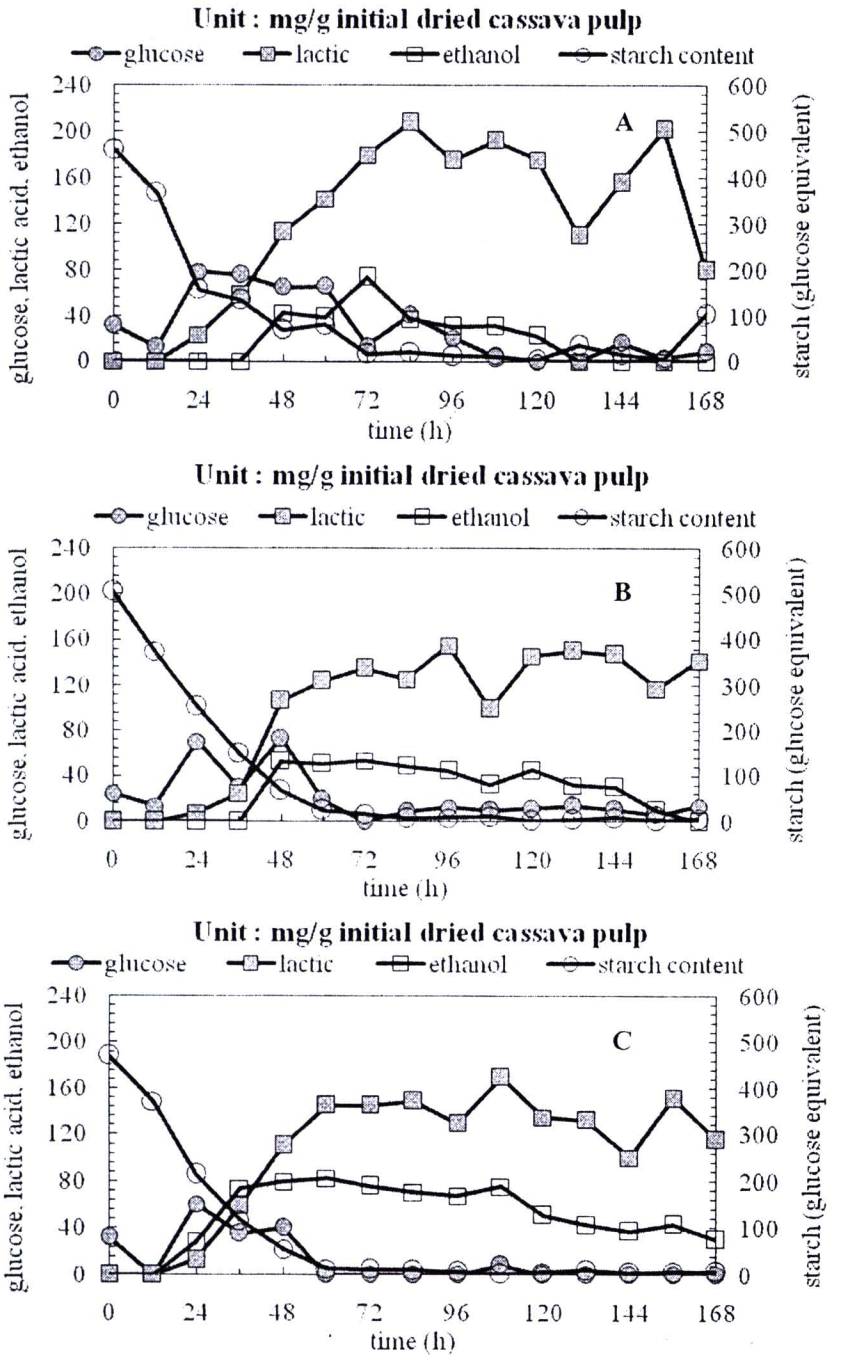
จากผลการทดลองใน 4.1เห็นได้ว่าภายใต้ภาวะการหมักดังกล่าวข้างต้นให้ปริมาณเซลล์และกรดแลกติกที่ผลิตได้ในปริมาณค่อนข้างน้อย และอัตราการนำไปใช้ของแหล่งคาร์บอนในกากมันค่อนข้างต่ำ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า แหล่งไนโตรเจนในภาวะการหมักใน 4.1 อาจมีปริมาณไม่เพียงพอที่จะนำไปผลิตเป็นเซลล์ ซึ่งท้ายที่สุดแล้วปริมาณเซลล์ที่มีน้อยส่งผลต่อการผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่ไม่สูงนัก ผู้วิจัยจึงปรับปรุงสูตรอาหารแข็งโดยทำการเติมแหล่งไนโตรเจนลงในอาหารแข็ง เมื่อทำการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด ได้แก่ ยูเรียและสารสกัดยีสต์ ที่ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นของยูเรีย 0.1 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดแลกติกมากที่สุดเท่ากับ 207.63 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการหมักโดยเติมสารสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตรที่ให้ผลผลิตของกรดแลกติกสูงสุด 208.15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้งเริ่มต้นของกากมัน และพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนสูงขึ้นมากกว่า 0.1 กรัมต่อลิตร ผลผลิตกรดแลกติกลดลงกว่าในภาวะที่ไม่มีการเสริมแหล่งไนโตรเจนและภาวะที่เติมแหล่งไนโตรเจนเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4.16 และ 4.17 จากผลการทดลองเห็นได้ชัดว่าแหล่งไนโตรเจนที่เติมเข้าช่วยสนับสนุนให้รานำแหล่งคาร์บอนในกากมันไปใช้ในการเจริญเติบโตของรามากกว่าที่จะสนับสนุนให้ราผลิตกรดแลกติก ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ทางอ้อมด้วยกลูโคซามีนและปริมาณของแหล่งคาร์บอนในกากมันที่ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับการหมักในภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน ซึ่งพบว่า เมื่อปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ราจะเจริญเติบโตได้ดีขึ้น โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีในการสนับสนุนการเจริญเติบโตของราในการหมักแบบอาหารแข็งกากมันสำปะหลังมากกว่าสารสกัดยีสต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.18

Mitchell และคณะ (1988) พบว่า ยูเรียมีประโยชน์ต่อการเจริญของ *Rhizopus oligosporus* เมื่อทำการผสมแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) และ ยูเรีย 0.25 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร ทำให้อัตราการเจริญของ colony radial เป็น 1.01 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง

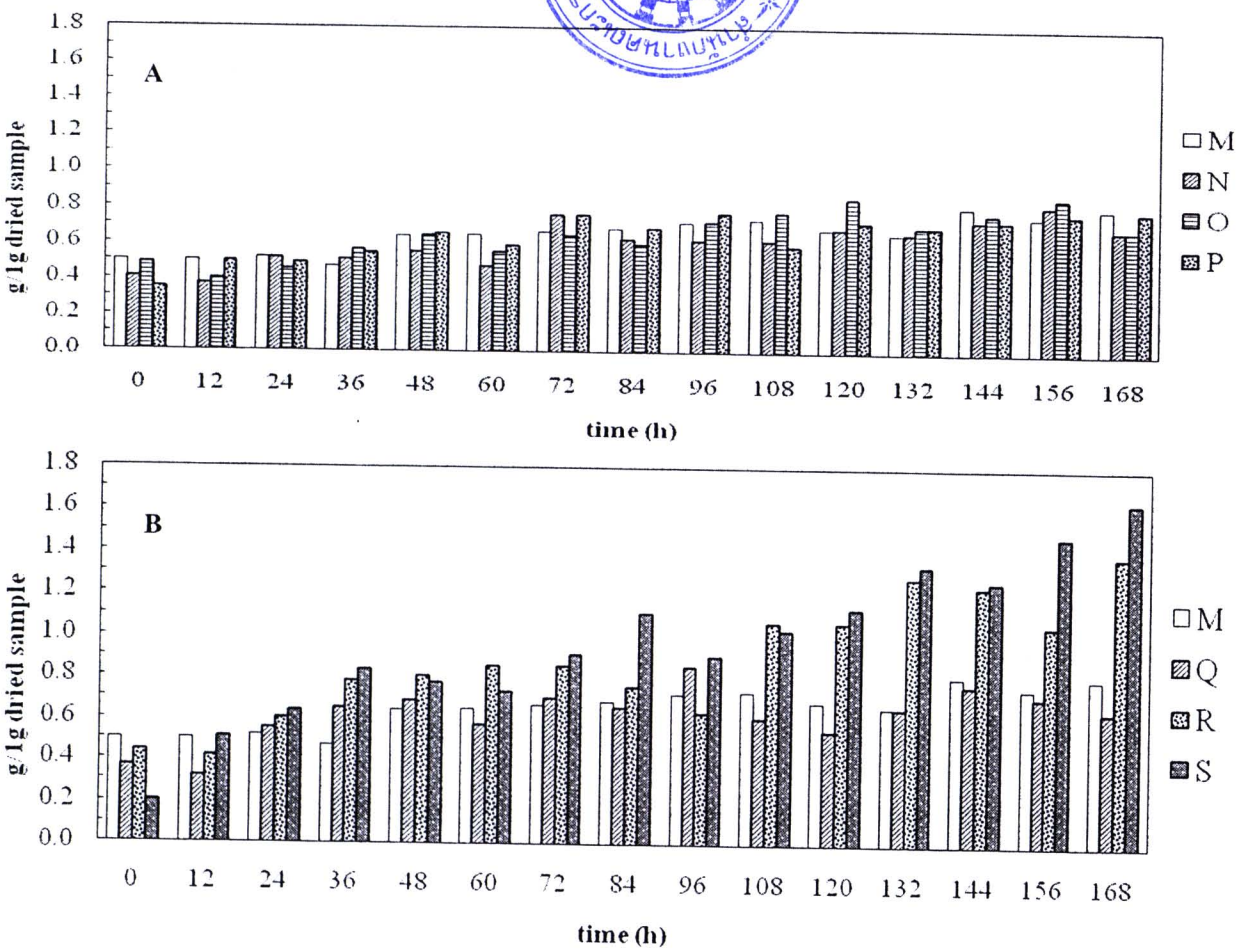
Adejoye และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของ *Pleurotus florida* เมื่อเทียบผลระหว่างการเติมยูเรียกับสารสกัดยีสต์ พบว่า ยูเรียให้น้ำหนักแห้งของไมซีเลีย 135.25 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ขณะที่สารสกัดยีสต์ ให้น้ำหนักแห้งของไมซีเลีย 116.65 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร แสดงให้เห็นว่ายูเรียสนับสนุนการเจริญเติบโตของ *Pleurotus florida* มากกว่าสารสกัดยีสต์



ภาพที่ 4.16 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาทีควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 เติมยูเรียเข้าไป A คือ 0.1 กรัมต่อลิตร B คือ 0.3 กรัมต่อลิตร C คือ 0.5 กรัมต่อลิตร



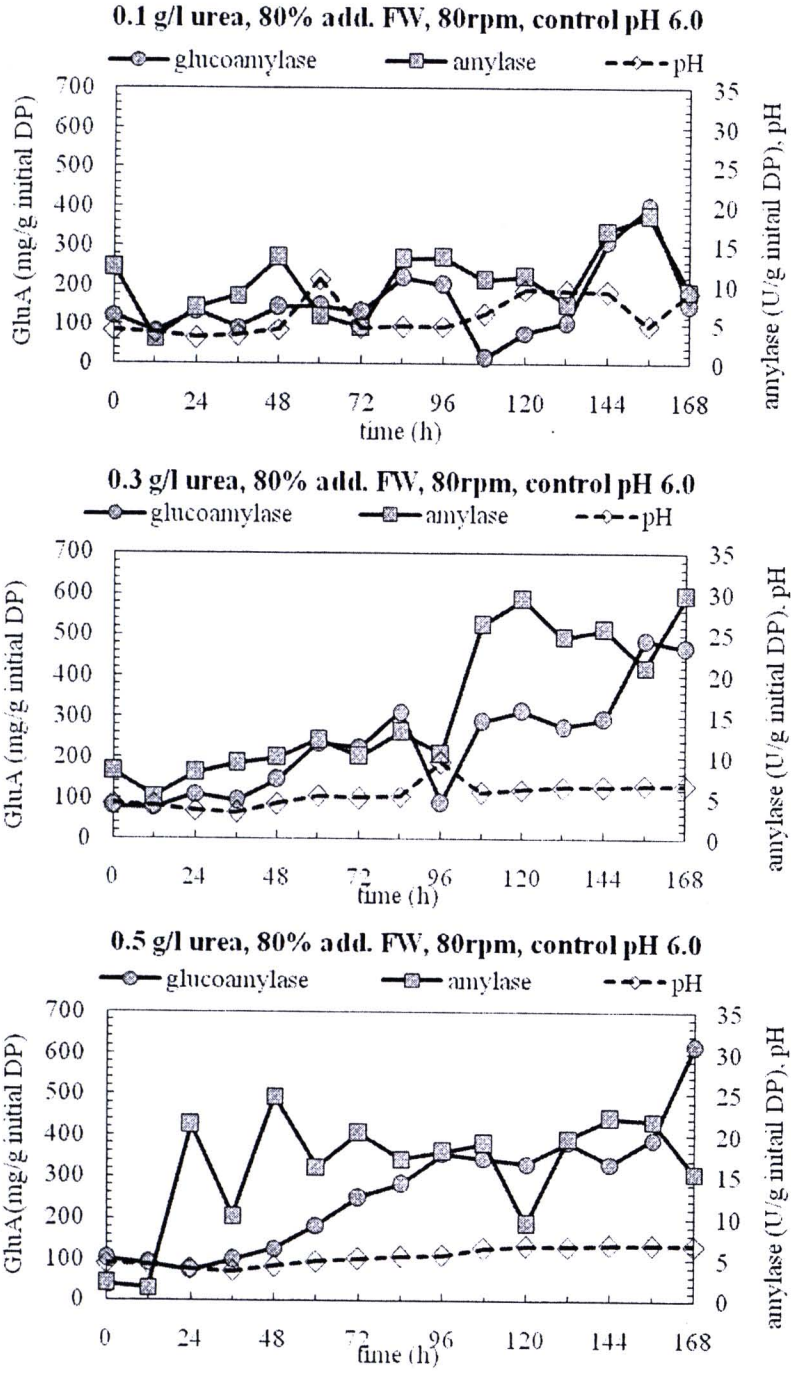
ภาพที่ 4.17 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติก และเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 สารสกัดยีสต์เข้าไป A คือ 0.1 กรัมต่อลิตร B, คือ 0.3 กรัมต่อลิตร C, คือ 0.5 กรัมต่อลิตร



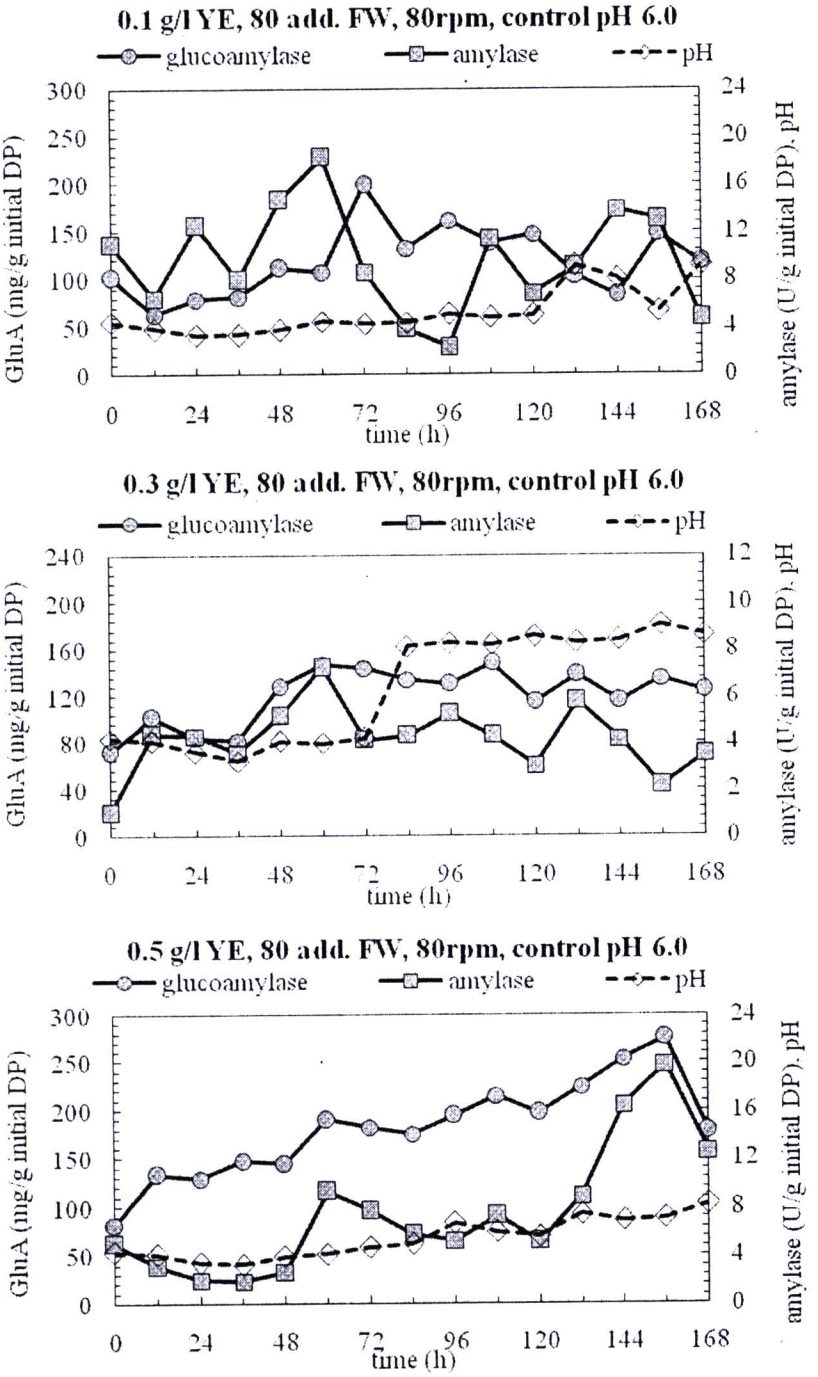
ภาพที่ 4.18 ปริมาณชีวมวลของ *R. oryzae* ในภาวะการเลี้ยงที่ไม่มีและมีแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ยูเรีย และสารสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

- 80% additional free water, 80rpm, control pH (M)
- 0.1 g/l yeast extract, 80% additional free water, 80rpm, control pH (N)
- 0.3 g/l yeast extract, 80% additional free water, 80rpm, control pH (O)
- 0.5 g/l yeast extract, 80% additional free water, 80rpm, control pH (P)
- 0.1 g/l urea, 80% additional free water, 80rpm, control pH (Q)
- 0.3 g/l urea, 80% additional free water, 80rpm, control pH (R)
- 0.5 g/l urea, 80% additional free water, 80rpm, control pH (S)

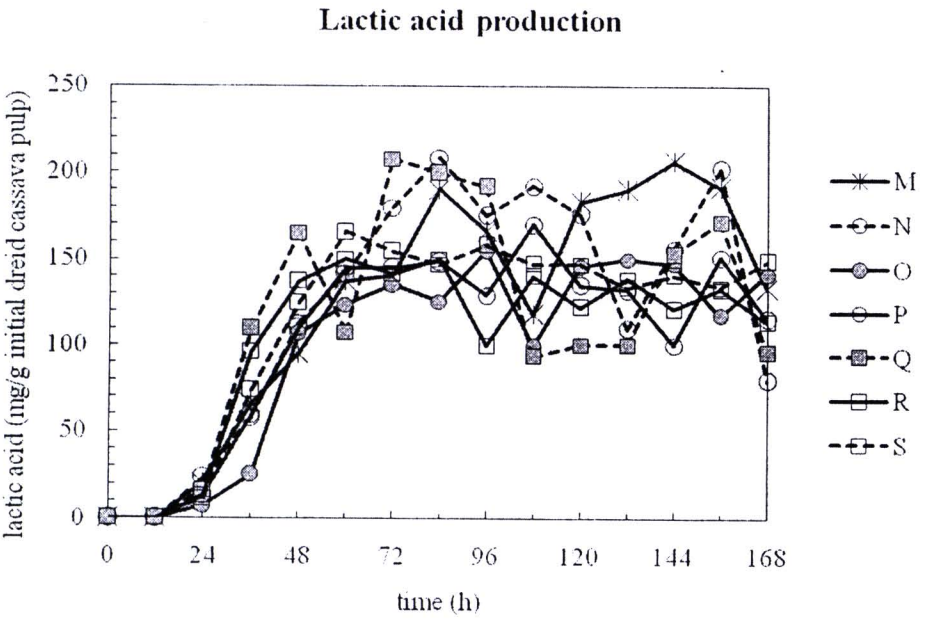
จากผลการทดลอง สังเกตได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อแหล่งคาร์บอนหมด ดังแสดงในภาพที่ 4.19 และ 4.20 อาจเป็นเพราะว่า แหล่งไนโตรเจนที่เติมเข้าไปทั้งยูเรียและสารสกัดยีสต์ เมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสแล้วจะถูกปล่อยออกมาในรูปของแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ (Juillard และคณะ, 1988; Tinson และคณะ, 1982) ซึ่งการเกิดแอมโมเนียนั้นจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงหรือชักนำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นระยะหนึ่ง (Tinson และคณะ, 1982 ; Spinnler และ Corrieu, 1989; Latrille และคณะ, 1992) ในช่วงแรกที่มีแหล่งคาร์บอนอยู่นั้นราเลือกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างผลผลิต ซึ่งระหว่างที่ราเจริญอย่างรวดเร็ว แอมโมเนียจะถูกนำไปใช้มากกว่าอัตราการไฮโดรไลซีสของยูเรียทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง รวมถึงกรดแลกติกที่ราผลิตออกมาด้วย แต่เมื่อแหล่งคาร์บอนเริ่มหมด จึงเหลือแหล่งไนโตรเจนแหล่งเดียวที่นำไปใช้ การเจริญเติบโต ทำให้แอมโมเนียที่เกิดขึ้นมีปริมาณมากขึ้น จึงมีแนวโน้มชักนำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นค่าที่ไม่เหมาะต่อการผลิตกรดแลกติกของรา *R. oryzae* ซึ่งอยู่ที่ 4.0-6.0 เมื่อเทียบกับปริมาณผลผลิตกรดแลกติกกับการหมักในภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนแล้วผลผลิตที่ได้ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 4.21



ภาพที่ 4.19 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลง ในระหว่างการหมักที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 4.20 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลง ในระหว่างการหมักที่มีสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

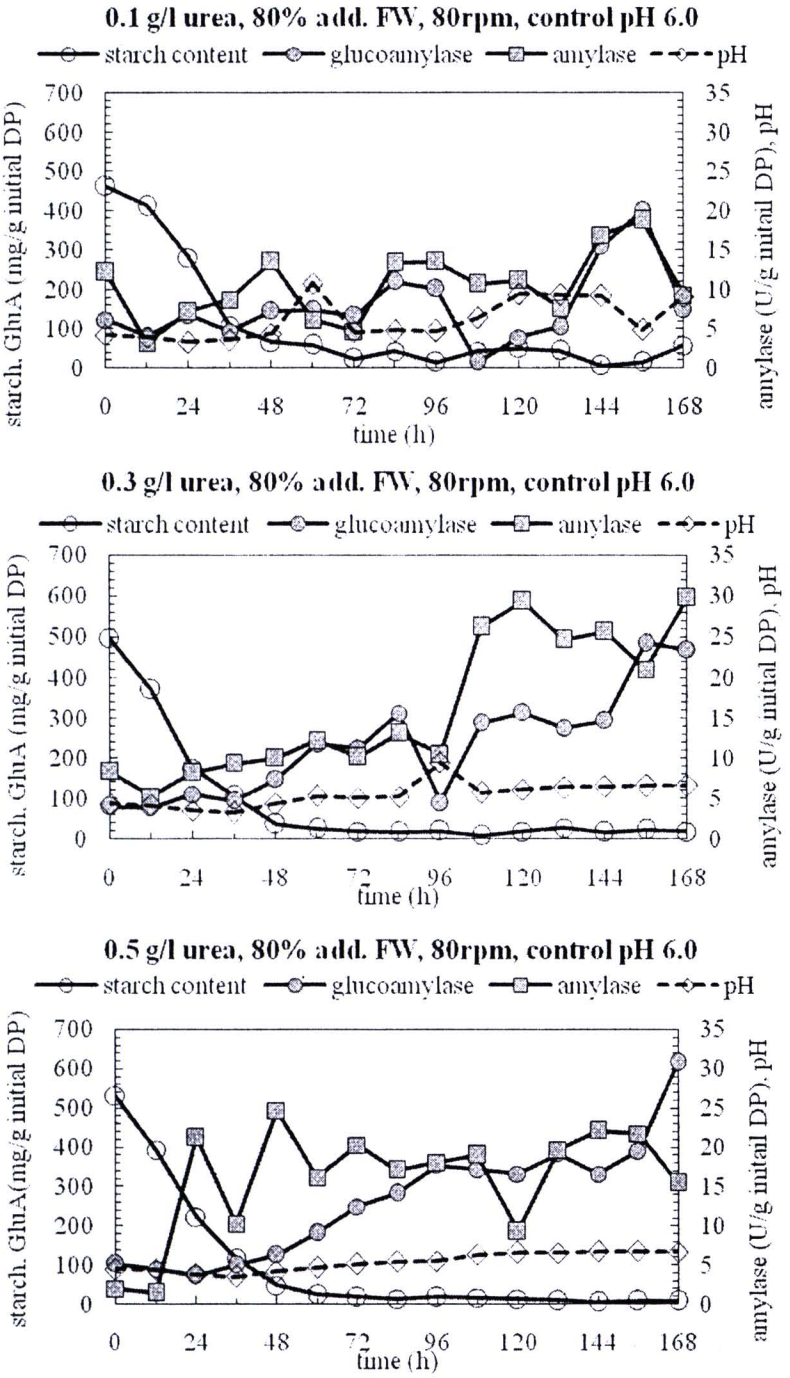


ภาพที่ 4.21 แสดงจลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกในภาวะที่ไม่มีและมีการเสริมแหล่งไนโตรเจน

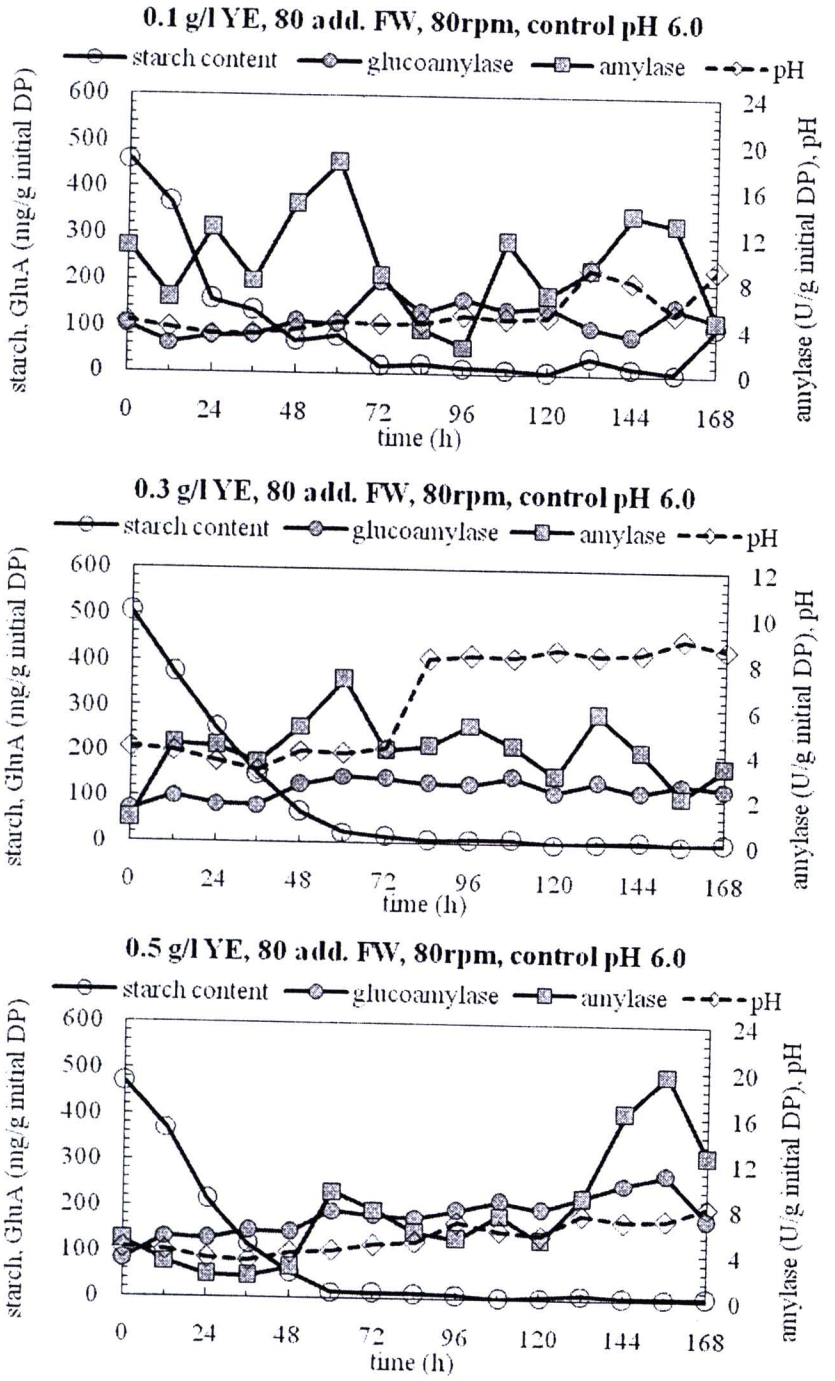
- 80% additional free water, 80rpm, control pH (M)
- 0.1 g/l yeast extract, 80% additional free water, 80rpm, control pH (N)
- 0.3 g/l yeast extract, 80% additional free water, 80rpm, control pH (O)
- 0.5 g/l yeast extract, 80% additional free water, 80rpm, control pH (P)
- 0.1 g/l urea, 80% additional free water, 80rpm, control pH (Q)
- 0.3 g/l urea, 80% additional free water, 80rpm, control pH (R)
- 0.5 g/l urea, 80% additional free water, 80rpm, control pH (S)

ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคอะไมเลสและอะไมเลส พบว่า มีปริมาณมากกว่าการหมักในภาวะแบบไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน ทำให้พบว่า ปริมาณแป้งที่อยู่ในกากมันนั้น ถูกย่อยเปลี่ยนเป็นกลูโคสอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในภาพที่ 4.22 และ 4.23

Zambare (2010) ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกลูโคอะไมเลสด้วยรา *Aspergillus oryzae* ภายใต้การหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ในส่วนการทดลองการเติมแหล่งไนโตรเจนเข้าไปนั้น ยูเรียสามารถเพิ่มผลผลิตกลูโคอะไมเลสถึง 10 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับการไม่ใส่แหล่งไนโตรเจน



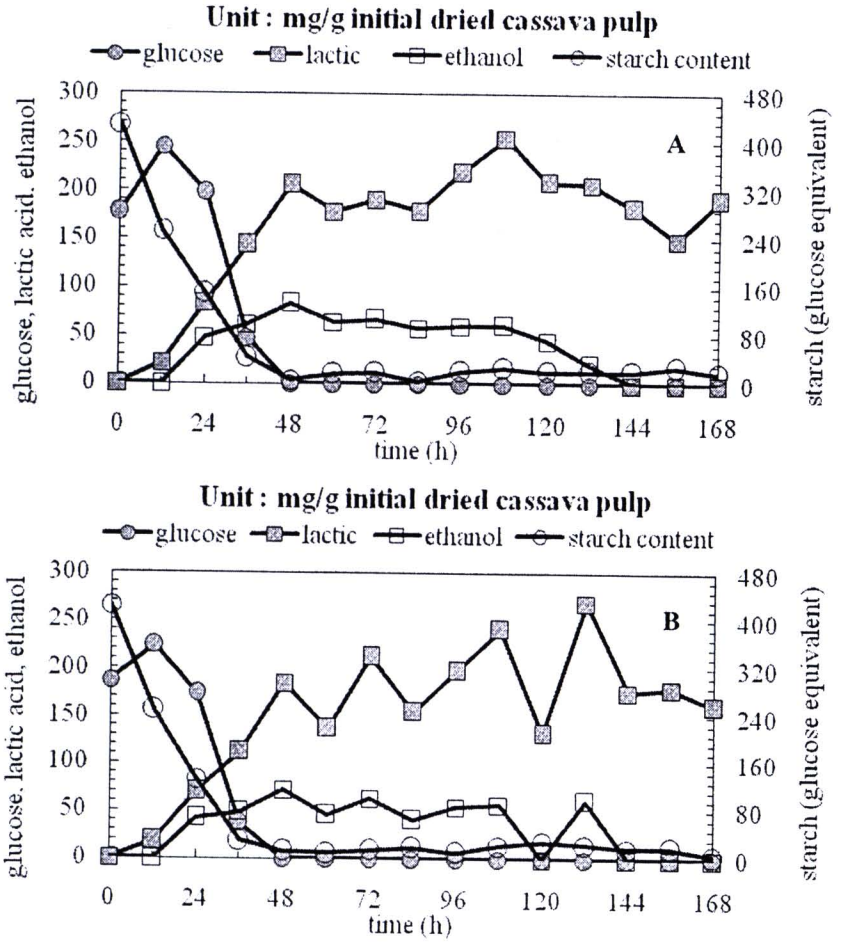
ภาพที่ 4.22 แสดงการผลิตกลูโคอะไมเลสและอะไมเลสของ *R. oryzae* ในภาวะที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน



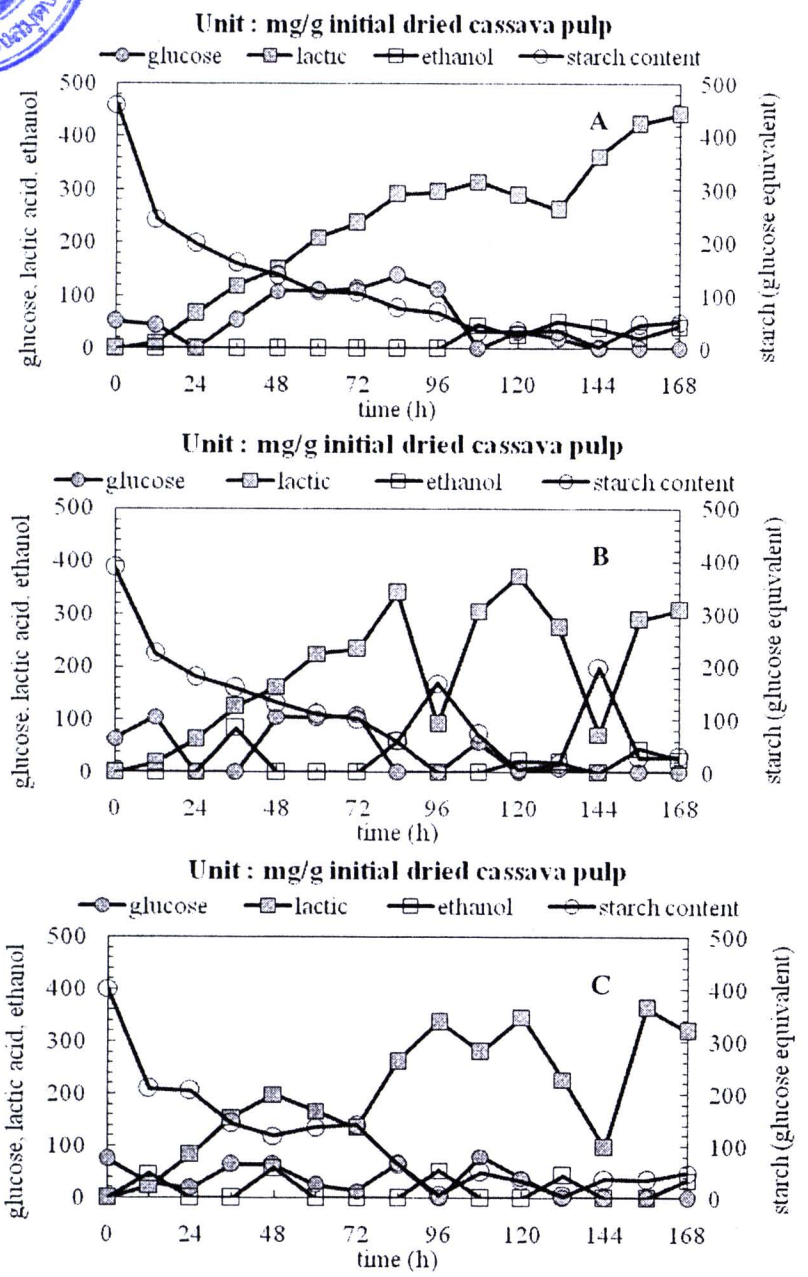
ภาพที่ 4.23 แสดงการผลิตกลูโคอะไมเลสและอะไมเลสของ *R. oryzae* ในภาวะที่มีสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

4.3 ศึกษาอิทธิพลของกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส

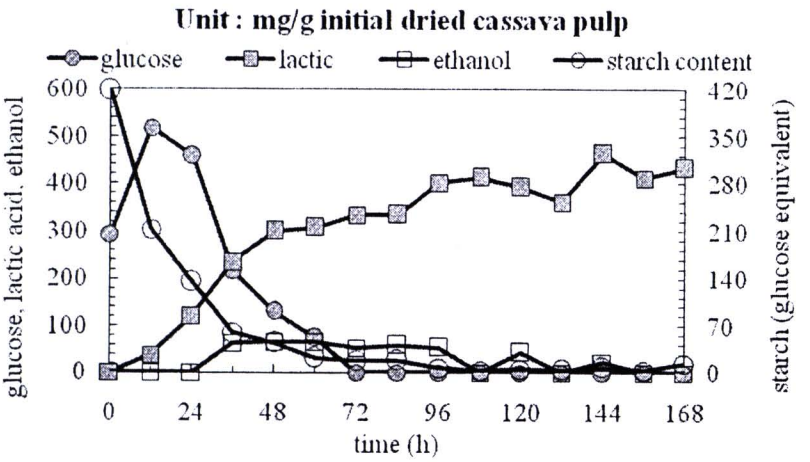
ผลการทดลองใน 4.1 และ 4.2 ชี้ให้เห็นว่าหากต้องการเพิ่มผลผลิตและอัตรการผลิตกรดแลกติกโดยการหมักแบบอาหารแข็ง จำเป็นต้องมีแหล่งคาร์บอนที่เพียงพอสำหรับ *R. oryzae* ที่จะนำไปใช้ในการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์กรดแลกติก จากอัตราการลดลงของแหล่งคาร์บอนที่ไม่สูงนักในผลการทดลองใน 4.1 และการเพิ่มขึ้นของอัตราการนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ในการทดลอง 4.2 เมื่อมีการเติมแหล่งไนโตรเจนซึ่งส่งผลให้มีปริมาณเซลล์มากขึ้น แสดงถึงความเป็นไปได้ในการเกิดภาวะ substrate limitation ในการผลิตกรดแลกติกจากกากมัน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทดลองเติมเอนไซม์เซลลูเลสและกลูโคอะไมเลสลงในอาหารแข็งกากมัน โดยมุ่งหวังว่า เอนไซม์ดังกล่าวจะช่วยเร่งอัตราการเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสในกากมันเพื่อเป็นกลูโคส ซึ่งราจะนำไปใช้ในการผลิตกรดแลกติกได้โดยตรง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การใช้ปริมาณกลูโคอะไมเลส 3.85 ยูนิตต่อกรัมแห้งกากมันเริ่มต้นร่วมกับเซลลูเลส 45 ยูนิตต่อกรัมแห้งกากมันเริ่มต้นเพียงพอต่อการย่อยแป้งและเซลลูโลสที่มีอยู่ในกากมันสด 7.5 กรัม เนื่องจากได้ปริมาณกรดแลกติกไม่แตกต่างจากการใช้เอนไซม์ในปริมาณมาก จากการทดลองในส่วนของการเติมกลูโคอะไมเลสเพิ่มเข้าไปอย่างเดียวมีผลต่อปริมาณกลูโคสอย่างมาก พบว่ามีกลูโคสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 12 เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่มีการเติมกลูโคอะไมเลสเพิ่มเข้าไป และลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป ซึ่งสอดคล้องกับผลผลิตของกรดแลกติกที่มีแนวโน้มการผลิตเพิ่มขึ้นต่อเนื่องจนถึงที่ชั่วโมง 48 หลังจากนั้นการผลิตกรดแลกติกค่อยข้างที่จะคงที่เนื่องจากกลูโคสถูกนำไปใช้หมดอย่างรวดเร็วหลังชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในภาพที่ 4.24 จากการศึกษาการเติมเซลลูเลสเข้าไป พบว่ามีปริมาณกลูโคสผลิตออกมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้รามีปริมาณกลูโคสที่เพียงพอในการใช้ผลิตกรดแลกติก ดังแสดงในภาพที่ 4.25 ในการทดลองในส่วนของที่มีการเสริมทั้งกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลสเข้าไปนั้น พบกลูโคสมีปริมาณสูงในระยะแรกสอดคล้องกับผลที่ได้จากส่วนการทดลองที่มีแต่การเติมกลูโคสอย่างเดียว ดังแสดงในภาพที่ 4.26 แต่มีปริมาณที่มากกว่าอันเนื่องมาจากการทำงานของเซลลูเลสที่ไปทำการย่อยเซลลูโลสที่อยู่ในกากมันทำให้ได้พวกออลิโกเมอร์ออกมาอีกจำนวนหนึ่งและอาจจะไปทำให้เม็ดแป้งที่แทรกซึมหรือถูกห่อหุ้มด้วยเซลลูโลสนั้นหลุดออกมาด้วย ทำให้มีสารตั้งต้นที่จะทำการเปลี่ยนเป็นกลูโคสเพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ได้มีแนวโน้มที่จะได้ปริมาณที่มากกว่าซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของกลูโคส ดังแสดงในภาพที่ 4.27



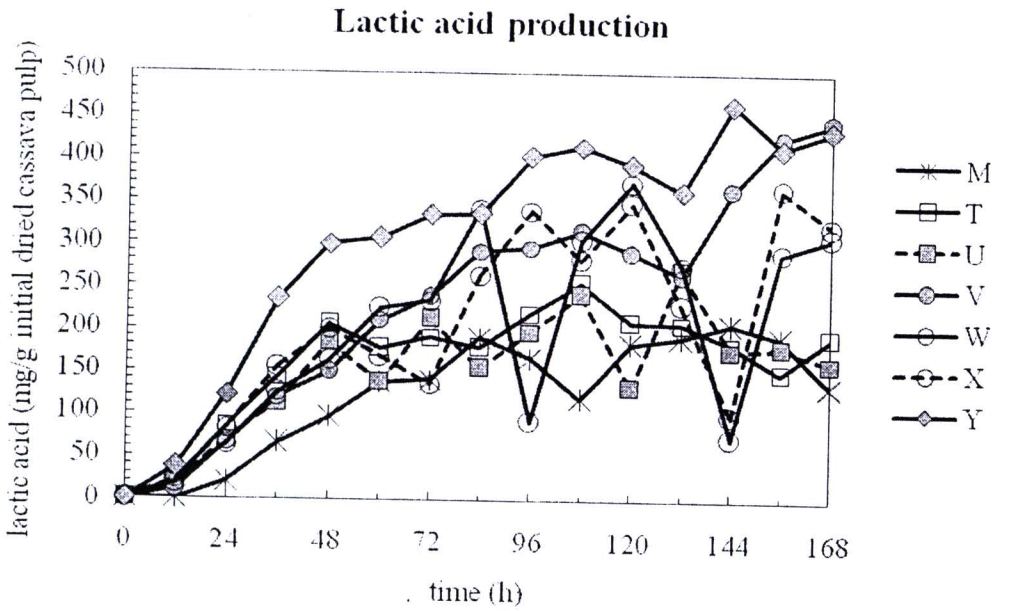
ภาพที่ 4.24 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เติมกลูโคอะไมเลสในอาหารแข็ง A คือ 3.85 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น, B คือ 7.70 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น



ภาพที่ 4.25 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เติมเซลลูเลสในอาหารแข็ง A คือ 45 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น, B คือ 92.5 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น, C คือ 182.5 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น



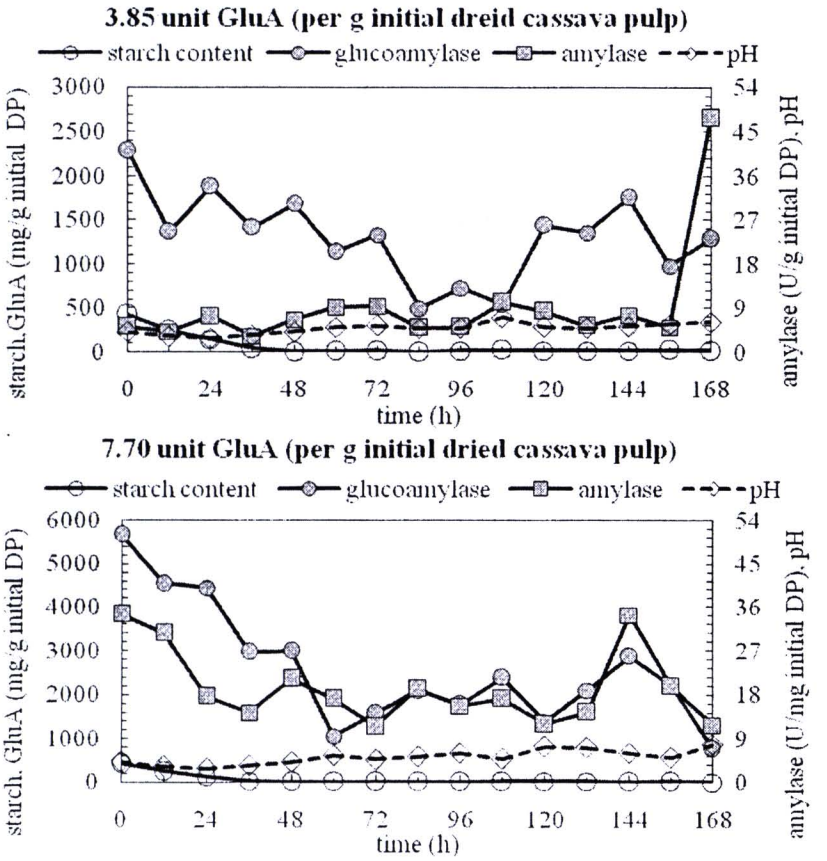
ภาพที่ 4.26 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เติมกลูโคอะไมเลส 3.85 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นร่วมกับเซลลูเลส 45 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น



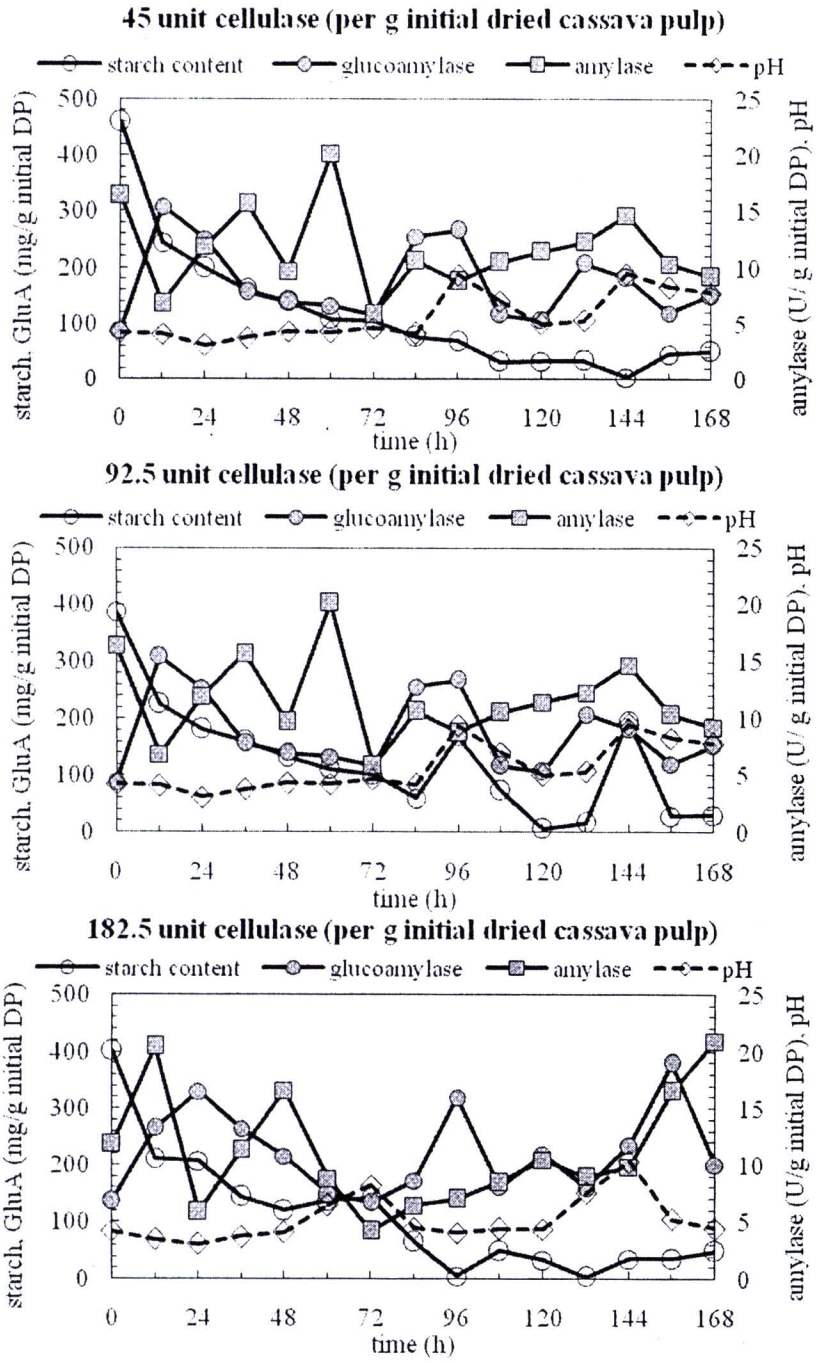
ภาพที่ 4.27 จลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีการเสริมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลสเข้าไป

- 80% additional free water, 80rpm, control pH (M)
- 3.85 unit glucoamylase / g initial dried cassava pulp (T)
- 7.70 unit glucoamylase / g initial dried cassava pulp (U)
- 45 unit cellulase / g initial dried cassava pulp (V)
- 92.5 unit cellulose / g initial dried cassava pulp (W)
- 182.5 unit cellulase / g initial dried cassava pulp (X)
- 3.85 unit glucoamylase / g initial dried cassava pulp + 45 unit cellulase / g initial dried cassava pulp (Y)

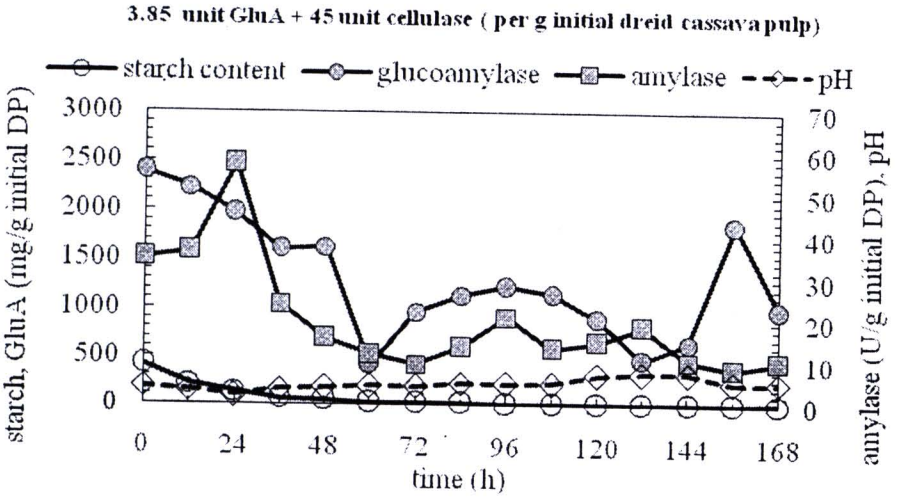
การศึกษาแอคติวิตีของกลูโคอะไมเลสและอะไมเลส พบว่าแอคติวิตีของอะไมเลสมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับในสภาะที่ไม่มีการเติมเอนไซม์เสริมเข้าไป ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าปริมาณแป้งที่มีมากขึ้นไปชักนำให้รามีการสร้างอะไมเลสเพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4.28- 4.30



ภาพที่ 4.28 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นร่วมกับกลูโคอะไมเลสที่เสริมลงไป ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยมีการเสริมกลูโคอะไมเลส 3.85และ 7.70 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น

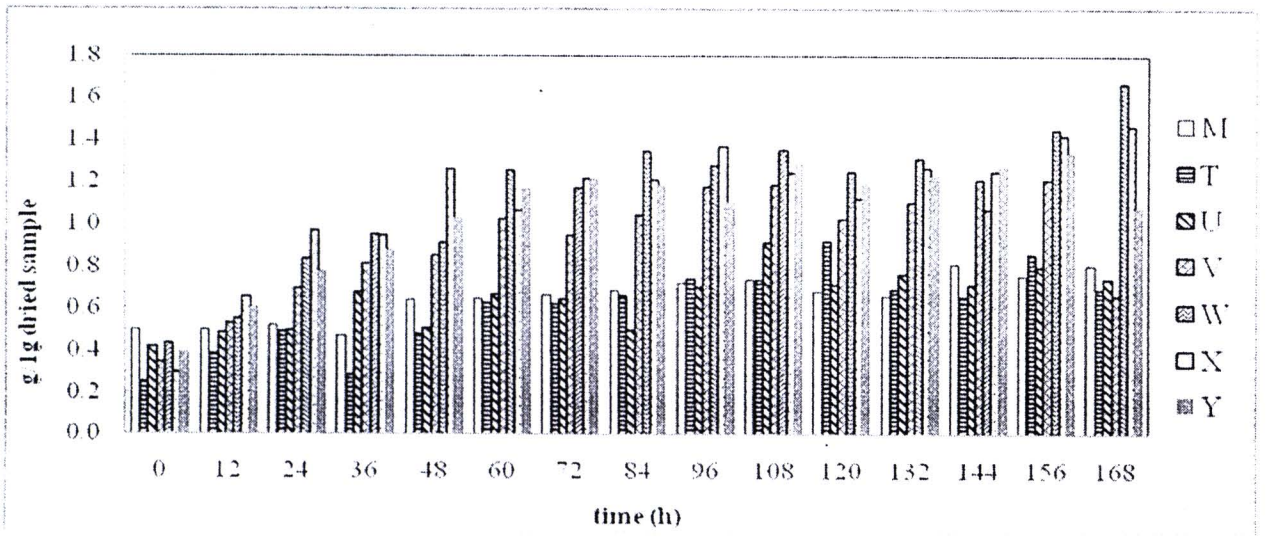


ภาพที่ 4.29 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีการเสริมเซลลูเลส 45 92.5 และ 182.5 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นเข้าไป



ภาพที่ 4.30 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นร่วมกับกลูโคอะไมเลสที่เสริมลงไป ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยมีการเสริมกลูโคอะไมเลส 3.85 และ เซลลูเลส 45 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นเข้าไป

จากการศึกษาปริมาณเซลล์ แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มการเจริญเติบโตของราที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4.31 โดยพบว่าในภาวะที่มีการเติมเซลลูเลสลงไปนั้น เซลล์จะรวมตัวเกาะกับกากมันเป็นก้อนซึ่งแยกออกจากน้ำอย่างเห็นได้ชัดดังแสดงในภาพที่ 4.32 แสดงให้เห็นว่าเซลลูเลสที่เสริมเข้าไปย่อยเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนของไฟเบอร์ที่อยู่ในกากมันกลายเป็นกลูโคสซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณซับสเตรทที่รานำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ ทำให้ปริมาณเซลล์ที่วิเคราะห์ได้จากชุดการทดลองนี้พบได้มากกว่าชุดการทดลองอื่น และเป็นการสนับสนุนผลของปริมาณเซลลูเลส 18.5 ไมโครลิตร เพียงพอต่อการย่อยเซลลูโลสที่อยู่ในกากมันสด 7.5 กรัม เพราะปริมาณเซลล์ที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกันในทุกๆ ภาวะที่มีการเสริมเซลลูเลสเข้าไป นอกจากนี้ลักษณะการเจริญของราบนพื้นผิวของกากมันดังในภาพที่ 4.32 ชี้ให้เห็นว่า การเจริญในลักษณะ surface culture ซึ่งเป็นหลักการของการหมักแบบอาหารแข็งส่งผลเอื้อต่อการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae*



ภาพที่ 4.31 แสดงปริมาณชีวมวลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยมีการเสริมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลสเข้าไป

□ 80% additional free water, 80rpm, control pH (M)

▤ 3.85 unit glucoamylase / g initial dried cassava pulp (T)

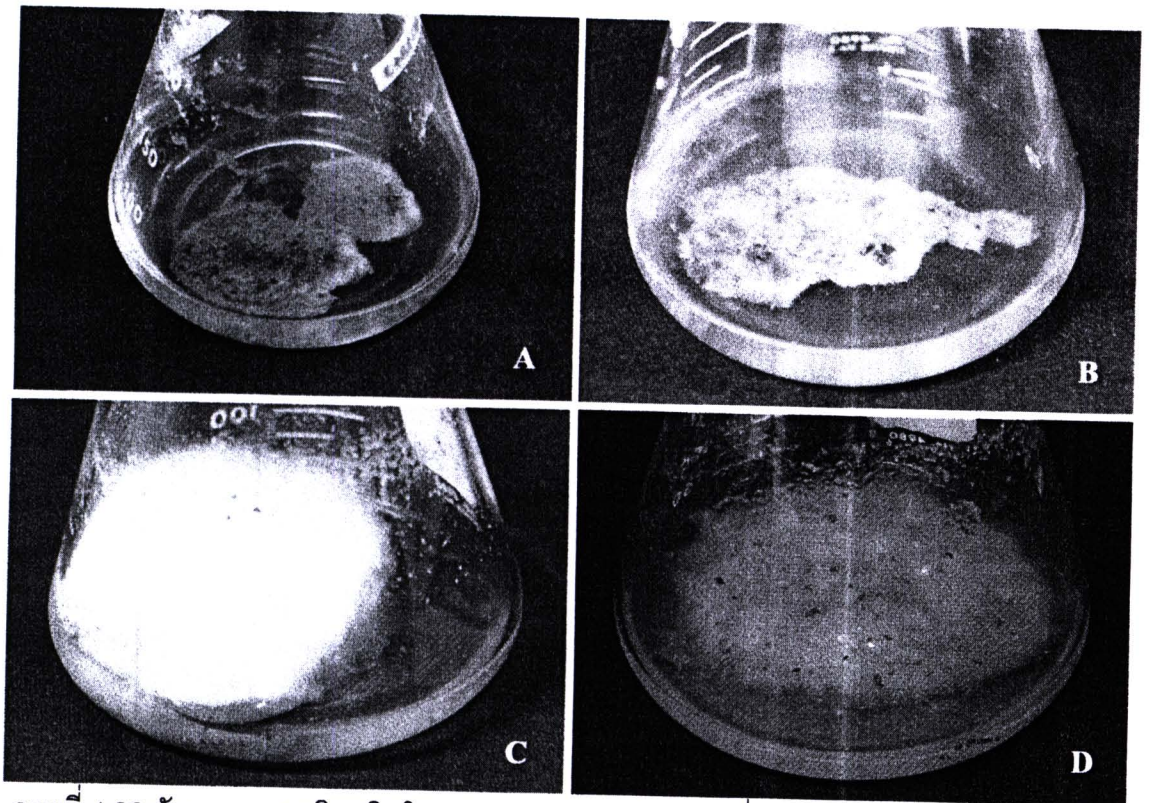
▧ 7.70 unit glucoamylase / g initial dried cassava pulp (U)

▨ 45 unit cellulase / g initial dried cassava pulp (V)

▩ 92.5 unit cellulose / g initial dried cassava pulp (W)

⁘ 182.5 unit cellulase / g initial dried cassava pulp (X)

▩ 33.85 unit glucoamylase / g initial dried cassava pulp + 45 unit cellulase / g initial dried cassava pulp (Y)



ภาพที่ 4.32 ลักษณะการเจริญเติบโตของรา *R. oryzae* ในภาวะที่มีการเติมอะไมเลสในอาหารแข็ง (แถวบน) เปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่มีการเติมอะไมเลส (แถวล่าง)

A คือ 3.85 unit glucoamylase + 45 unit cellulase (per g initial dried cassava pulp), 80% additional free water, 80 rpm, control pH 6.0

B คือ 45 unit cellulase / g initial dried cassava pulp, 80% additional free water, 80 rpm, control pH 6.0

C คือ 0.5 g/l urea, 80% additional free water, 80 rpm, control pH 6.0

D คือ 80% additional free water, 80 rpm, control pH 6.0